

THESIS

MARBURG

1968

Untersuchungen über
den Ornithin-Cyclus und die Urease bei
Micrococcus denitrificans
Beijerinck

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Philipps-Universität zu Marburg

Vorgelegt von

Udo Hiort

aus Glogau (Schlesien)

Marburg/Lahn 1968



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Untersuchungen über
den Ornithin-Cyclus und die Urease bei
Micrococcus denitrificans
Beijerinck

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

Vorgelegt von

Udo Hlort

aus Glogau (Schlesien)

Marburg/Lahn 1968

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Philipps-Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am 25. Oktober 1968

Tag der mündlichen Prüfung am 16. November 1968

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Kating

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Nultsch

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
<u>A. Einleitung und Problemstellung</u>	4
<u>B. Material und Methoden</u>	7
I. Kulturverfahren	7
1. Versuchsorganismus	7
2. Kulturverfahren	7
a) Normalkultur	7
b) Umpflanzkulturen	10
3. Trockengewichtsbestimmung und Trübungsmessung	10
II. Bestimmung der spezifischen Aktivität der Enzyme	12
1. Gewinnung des enzymatischen Rohmaterials	12
2. Herstellung des Acetontrockenpulvers	12
3. Enzymnachweise im Acetontrockenpulver-Extrakt	13
a) Bestimmung der Urease-Aktivität	13
b) Bestimmung der Carbamoylphosphat-synthetase-Aktivität	14
c) Bestimmung der Ornithincarbamoyl-transferase-Aktivität	16
d) Bestimmung der Aktivität der "argininsynthetisierenden Enzyme"	17
e) Bestimmung der Arginase-Aktivität	18
4. Eiweißbestimmung der Acetonpulver-Extrakte	19
<u>C. Ergebnisse</u>	20
I. Das Wachstum von <i>Micrococcus denitrificans</i> auf verschiedenen N-Quellen	20
1. Der Einfluß verschiedener N-Quellen auf das Wachstum bei aeroben Kulturbedingungen	20
2. Der Einfluß verschiedener N-Quellen auf das Wachstum bei anaeroben Kulturbedingungen	24
3. Änderungen des pH-Wertes während des Wachstums unter verschiedenen Kulturbedingungen	25
4. Eiweißsynthese während des Wachstums unter verschiedenen Kulturbedingungen	26
II. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus von <i>Micrococcus denitrificans</i> in Abhängigkeit von der N-Quelle und Kulturdauer	29

1. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus nach Wachstum auf Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff und Glutamin	29
2. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus nach Wachstum auf Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin	50
3. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus nach Wachstum auf Ornithin, Citrullin und Arginin	64
4. Diskussion der Ergebnisse über die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus	78
III. Untersuchungen über die Ureasebildung in <i>Micrococcus denitrificans</i>	85
1. Versuche zum Nachweis einer Urease-Aktivität in Kulturen mit Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat als N-Quelle	85
2. Adaptive Ureasebildung beim Wachstum auf Harnstoff als alleiniger N-Quelle unter aeroben Kulturbedingungen	87
3. Die spezifischen Aktivitäten der Urease in Abhängigkeit von der N-Quelle und Kulturdauer unter aeroben und anaeroben Bedingungen	90
a) Der Einfluß von Harnstoff und Glutamin auf die Ureasebildung unter aeroben Kulturbedingungen	90
b) Der Einfluß von Glutaminsäure, Asparaginsäure und Alanin auf die Ureasebildung unter aeroben Kulturbedingungen	92
c) Der Einfluß von Ornithin, Citrullin und Arginin auf die Ureasebildung unter aeroben Kulturbedingungen	93
d) Der Einfluß verschiedener N-Quellen auf die Ureasebildung unter anaeroben Kulturbedingungen	95
4. Diskussion der Ergebnisse über die Ureasebildung von <i>Micrococcus denitrificans</i>	96
D. <u>Zusammenfassung</u>	99
E. <u>Arbeitsvorschriften</u>	102
1. Prüfung auf Sauerstoff in den anaerob aufwachsenden Kulturen	102
2. Eichkurve zur Eiweißbestimmung	102
3. Ammoniakbestimmung	103
4. Berechnung einer spezifischen Enzymaktivität	104
5. Herstellung der Substratlösung zur Bestimmung der Aktivität der "argininsynthetisierenden Enzyme"	105

	Seite
6. Herstellung der Arginasepräparatlösung	106
7. Herstellung der Ureasepräparatlösung	106
8. Herstellung der Substratlösung für die Bestimmung der Carbamoylphosphat-synthetase-Aktivität	106
9. Herstellung von Diammonium-carbamylphosphat	106
10. Aufstellung der Eichkurve zur Citrullinbestimmung	108
F. <u>Literaturverzeichnis</u>	111

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Der von H.A. KREBS u. K. HENSELEIT (1932) bei ihren Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper erstmals nachgewiesene Ornithin-Cyclus hat bei Amphibien und Säugetieren die Aufgabe, das aus dem Eiweißabbau anfallende Ammoniak zu binden. Der resultierende Harnstoff wird aus dem Stoffwechsel ausgeschieden. Abb.1 gibt unsere heutigen Vorstellungen über den Ablauf des Kreisprozesses wieder.

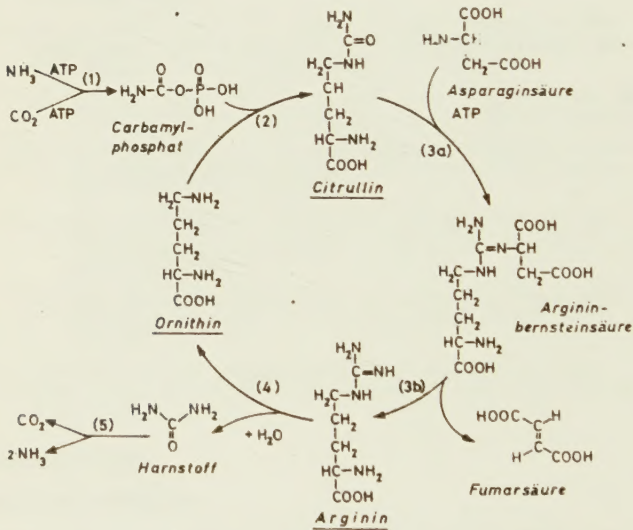


Abbildung 1: Die Harnstoffbildung durch den Ornithin-Cyclus

- Enzyme: 1. Carbamoylphosphat-synthetase
 2. Ornithincarbamoyl-transferase
 3a und 3b "argininsynthetisierende Enzyme" (3a Argininosuccinat-synthetase, 3b Argininosuccinase)
 4. Arginase, 5. Urease

Erst in jüngster Zeit ist der vollständige Ornithin-Cyclus auch

in pflanzlichen Organismen nachgewiesen worden (Mikroorganismen: siehe u.a. A.M. SRB u. N.N. HOROWITZ, 1944; I.R.S. FINCHAM u. J.B. BOYLEN, 1955; H.J. VOGEL u. D.M. BONNER, 1959; H. KATING, 1962a; L. ECKERT u. Mitarb., 1966; höhere Pflanzen: siehe u.a. R. KASTING u. C.C. DELWICHE, 1958; I. REIFER u. L. BURACZEWSKA, 1958; H. KATING, 1963). Es liegt auf der Hand, daß dieser Kreisprozeß bei Mikroorganismen und höheren Pflanzen nicht wie beim tierischen Organismus zur Entgiftung des vornehmlich im Zuge der Eiweißverwertung anfallenden Ammoniaks dient. Die Untersuchungen in unserem Laboratorium (H. KATING 1962a,b; 1963; L. ECKERT u. Mitarb., 1966; L. ECKERT, 1968) weisen darauf hin, daß der Ornithin-Cyclus bei den Hefen *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis* einen zweiten Weg der Ammoniakassimilation neben der direkten Aminierung von α -Ketosäuren darstellt. So geben auch I. WITT u. H. HOLZER (1964) an, daß bei Bäckerhefe etwa ein Drittel des gebotenen Ammoniaks zur Biosynthese von Carbamylphosphat verbraucht wird. Carbamylphosphat kann mit Ornithin im ersten Schritt des Kreisprozesses reagieren.

Zur Untermauerung der Hypothese, daß bei Mikroorganismen der Ornithin-Cyclus eine zweite Eingangspforte für das Ammoniak in den Stickstoff-Stoffwechsel ist, schien es zweckmäßig zu sein, bei einem denitrifizierenden Bakterium die Rolle des Kreisprozesses bei der Assimilation des Ammoniaks zu untersuchen. Als Versuchsorganismus wurde *Micrococcus denitrificans* ausgewählt. Außer der Nitratreduktion und den damit im Zusammenhang stehenden energetischen Problemen (siehe u. a. A.J. KLUYVER u. W. VERHOEVEN, 1954a,b; W. VERHOEVEN u. Mit-

arb., 1954; W. VERHOEVEN, 1956; L.P. VERNON, 1957; L.P. VERNON u. F.G. WHITE, 1957; C.A. FEWSON u. D.J.D. NICHOLAS, 1961; F. PICHINOTY u. L. D'ORNANO, 1961; J.P. CHANG u. J.G. MORRIS, 1962; F. PICHINOTY, 1964) ist der N-Stoffwechsel dieses Organismus noch weitgehend unbekannt. An weiteren Arbeiten über den N-Stoffwechsel liegen meines Wissens lediglich Befunde von A.K. BANERJEE (1966) über den Methionin-Stoffwechsel und von H.KALT-WASSER (1968) über den Nachweis einer Uricase vor.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu prüfen, ob bei *M. denitrificans* der Ornithin-Cyclus aktiv ist. Hierbei sollten vornehmlich die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Kreisprozesses und der Urease festgestellt werden, um diese Ergebnisse mit den bei den Hefen *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis* gewonnenen entsprechenden Daten vergleichen zu können. Besonders günstig für diese Untersuchungen schien *M. denitrificans* deswegen zu sein, weil er sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen zu wachsen vermag und dadurch weitere Schlüsse über die Wirksamkeit der Enzyme des Ornithin-Cyclus ermöglicht werden.

B. M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

I. KULTURVERFAHREN

1. Versuchsorganismus

Die Untersuchungen wurden mit dem von M. VOGT (1965) isolierten Bakterium *M i c r o c o c c u s d e n i t r i f i c a n s* Beijerinck, Stamm 11 (Sammlung des Instituts für Mikrobiologie der Universität Göttingen) durchgeführt¹⁾. Der Organismus wurde als Dauerkultur auf Schrägagarröhrchen (mit 0,5% Glucose; 0,5% Kaliumnitrat; 0,5% Pepton; 1,5% Agar-Agar, alle Substanzen Fa. Merck) im Kühlschrank gehalten.

2. Kulturverfahren

a) Normalkultur

Zur Gewinnung des Impfmateri als für die Versuchsansätze wurden von der Dauerkultur 24 Schrägagarröhrchen beimpft und diese 24 Std. lang bei 28°C im Brutschrank gehalten. Von diesen Agarröhrchen wurde das Bakterium in ein mit 85 ml sterilisiertem Leitungswasser gefülltes Schüttelkölbchen übergeimpft. Mit 10 ml der homogenen Bakteriensuspension wurde jeweils ein Kulturkolben (1000 ml Inhalt/500 ml Nährlösung) angeimpft.

Die von M. VOGT (1965) angegebene Nährlösung zur organotrophen Kultur des Versuchsorganismus wurde geringfügig abgeändert. Es wurden folgende Stammlösungen angesetzt:

A 1,0 g Ammoniumchlorid, p.a. (Fa. Merck)

¹⁾ Herrn Professor Dr. H.G. S c h l e g e l, Direktor des Instituts für Mikrobiologie der Universität Göttingen, danke ich für die Überlassung des Stammes und für wichtige Hinweise zur Kultur von *M i c r o c o c c u s d e n i t r i f i c a n s*.

- 0,5 g Kaliumchlorid, p.a. (Fa.Merck)
0,2 g Magnesiumsulfat $\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$, p.a. (Fa.Merck)
5,0 g Kaliumnitrat, p.a. (Fa.Merck)
200 ml deionisiertes Wasser
- B 0,55 g Natriumhydrogencarbonat, p.a. (Fa.Merck)
200 ml deionisiertes Wasser
- C 5,0 g Glucose, für die Bakteriologie (Fa.Merck)
200 ml deionisiertes Wasser
- D 1,0 g Kaliumdihydrogenphosphat, Puffer-
substanz nach Sörensen (Fa.Merck)
1,37 g Dinatriumhydrogenphosphat $\cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$,
Puffersubstanz nach Sörensen (Fa.Merck)
200 ml deionisiertes Wasser
- E 10,0 mg Äthylendiamintetraessigsäure-Dina-
triumsals Titriplex III (=EDTA),
zur Metalltitration (Fa.Merck)
2,0 mg Eisen-II-Sulfat $\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$, p.a. (Fa.Merck)
2,0 mg Natriummolybdat $\cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$, p.a. (Fa.Merck)
10,0 mg Calciumchlorid $\cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$, p.a. (Fa.Merck)
195 ml deionisiertes Wasser
- F 5,0 ml Hoagland'sche Spurenelementlösung

Die Lösungen A, B, D, E und F wurden im Autoklaven und die Lösung C dreimal fraktioniert im Dampftopf sterilisiert. Nach dem Abkühlen wurden die Lösungen vereinigt. Je nach Versuchsansatz wurde die N-Quelle Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat ersetzt durch N-äquivalente Mengen von:

- 5,0 g L(+)-Glutamin, f.biochem.Zwecke (Fa.Merck)
10,2 g L(+)-Glutaminsäure, f.biochem.Zwecke (Fa.Merck)
9,2 g L(+)-Asparaginsäure, f.biochem.Zwecke (Fa.Merck)
6,2 g L(+)-L-Alanin, f.biochem.Zwecke (Fa.Merck)
5,8 g L(+)-Ornithinmonochlorid, f.biochem.Zwecke (Fa.Merck)
2,1 g Harnstoff, p.a. (Fa.Merck)
3,0 g L-Arginin (Fa.Schuchardt)
6,0 g L-Citrullin (Fa.Schuchardt)

Die N-Substanzen wurden gelöst, mit 1 n HCl oder 1 n NaOH auf den pH-Wert 7,0 eingestellt und von den anderen Lösungen ge-

trennt fraktioniert im Dampftopf sterilisiert.

Der Organismus wurde unter sterilen Bedingungen in Dunkelheit (B. MÜTZE, 1963) bei 28°C im Brutschrank in Standkolben (1000 ml) mit jeweils 500 ml Nährlösung unter Magnetrührung kultiviert (Abb.2). Durch Vorschalten eines Stelltransformators

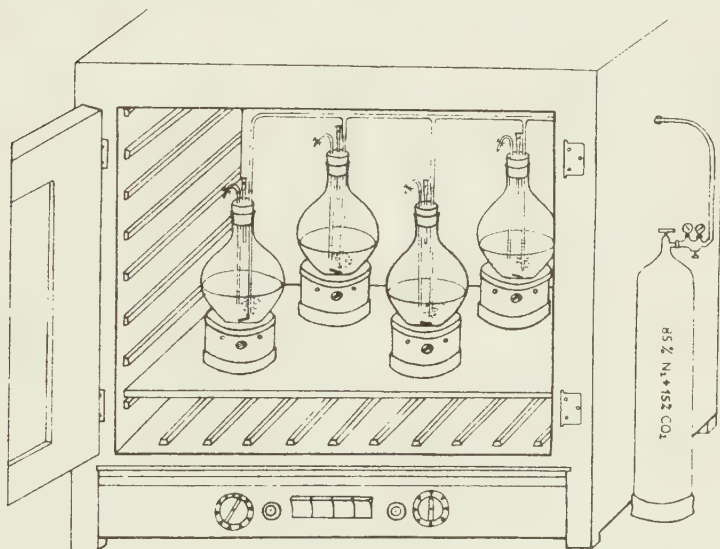


Abbildung 2: Brutschrank mit Magnetrührern, Kulturkolben und Begasungsvorrichtung zur Kultur von *Micrococcus denitrificans*

konnte in den Kolben eine gleichmäßige Umwälzung des Kulturmediums eingestellt werden. Zur Kultur unter aeroben Bedingungen wurden die Kolben mit Zellstoffstopfen verschlossen. Zur Herstellung der anaeroben Bedingungen wurden die

Standkolben mit einem Gemisch aus 85% N_2 und 15% CO_2 (Prüfgasqualität, Fa. Lindes Eismaschinen, Sauerstoffgehalt $<0,005\%$) begast (Prüfung des Sauerstoffgehaltes siehe Arbeitsvorschriften, S.102). Die Kolben wurden hierzu mit Gummistopfen verschlossen. Diese waren mit einer Gaseinlaßkanüle, die in das Kulturmedium reichte, sowie mit einem Bunsenventil als Gasauslaß versehen. - Die Gummistopfen wurden durch halbstündiges Auskochen in einer 1%igen Sodalösung sterilisiert und dann mit sterilisiertem Wasser abgespült.

b) Umpflanzkulturen

Zur Untersuchung der enzymatischen Aktivitäten unter *a n a e r o b e n* Bedingungen mußte das zuvor beschriebene Kulturverfahren für die organischen N-Quellen (also außer der Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat-Kultur) geändert werden. *M. d e n i t r i f i c a n s* wächst nämlich unter Sauerstoff-Abschluß nicht auf den organischen N-Quellen (siehe Abb.7 S.25). Es mußte deshalb eine vorgezogene Bakterienmasse auf diese Nährmedien umgepflanzt werden. Hierzu wurde der Versuchsorganismus auf 24 Schrägagarröhrchen 24 Std. lang vorgezogen und dann in 500 ml Nährlösung (mit 0,5% Glucose; 0,5% Kaliumnitrat; 0,5% Pepton) übergeimpft und 24 Std. lang bei 28°C unter Magnetrührung *a e r o b* angezogen. Die Bakterienmasse wurde in sterilisierten und mit Aluminiumfolie abgedeckten Zentrifugengläsern von der Nährlösung abgetrennt und hiervon eine bestimmte größere Menge in die Standkolben mit der neuen N-Quelle für die Versuche unter *a n a e r o b e n* Kulturbedingungen umgepflanzt.

3. Trockengewichtsbestimmung und Trübungsmessung

Zur Bestimmung des Trockengewichts wurden 25 ml Bakteriensus-

pension 30 Min. lang bei 4500 U/Min. zentrifugiert, mit deionisiertem Wasser gewaschen und wiederum zentrifugiert. Insgesamt wurde die Bakterienaufschwemmung zweimal gewaschen. Zur Inaktivierung der Enzyme wurde das Erntematerial zuerst 30 Min. im Trockenschrank bei 70°C erhitzt und danach in einem heizbaren Vakuumexsikkator bei 60°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Trockengewichte wurden aus zwei Zentrifugengläsern mit bekanntem Leergewicht durch Differenzmessung errechnet.

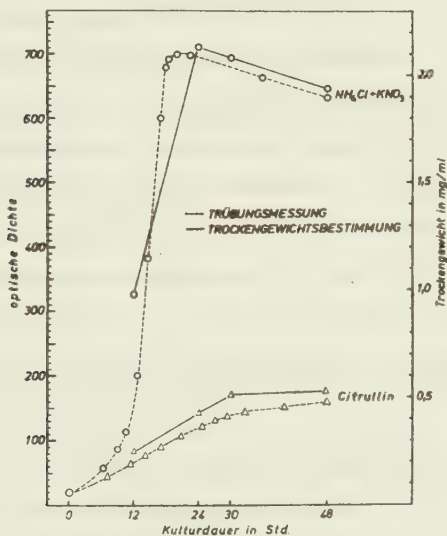


Abbildung 3: Vergleichende Untersuchungen der Substanzproduktion durch Trübungsmessung und Trockengewichtsbestimmung. Nährlösungen mit Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat beziehungsweise Citrullin als N-Quelle. Trockengewichtsbestimmung zu den angegebenen Erntezeiten; Trübungsmessungen stündlich

Die Trübungsmessungen erfolgten mit dem EEL-Nephelometer in Verbindung mit dem EEL-Galvanometer UNICALVO 200 (beide Geräte

Fa. Mauler-Nukleonik, Solingen). Hierbei wird die Streuung eines Lichtstrahls nach der Reflexion an den einzelnen Bakterien gegen einen Standard gemessen. Dünne Bakteriensuspensionen wurden direkt, dichte nach einer Verdünnung im Verhältnis 1 : 10 gemessen.

Vergleichende Untersuchungen der Substanzproduktion durch Bestimmung des Trockengewichtes einerseits und durch Trübungsmessung andererseits zeigten, daß eine weitgehende Übereinstimmung zwischen dem Kurvenverlauf der Trockensubstanzzunahme und der Zunahme der Bakteriendichte besteht (Abb.3).

Während der Versuche wurden zur Trübungsmessung die Proben aus den a e r o b gezogenen Kulturen mit sterilisierten Pipetten entnommen. Bei den Kolben, in denen die a n a e r o b aufwachsenden Kulturen gezogen wurden, war in den Gummistopfen ein dünnes Glasrohr mit einem Gummischlauch und einem Quetschhahn eingelassen. Hiermit konnten die Proben mittels des im Kulturkolben durch die Begasung herrschenden schwachen Überdrucks leicht entnommen werden.

II. BESTIMMUNG DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT DER ENZYME

1. Gewinnung des enzymatischen Rohmaterials

Das Versuchsmaterial wurde nach 12, 24, 30 und 48 Stunden durch Zentrifugieren bei 7°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) geerntet. Die Zellen wurden danach zweimal mit etwa 4°C kaltem, deionisiertem Wasser gewaschen, zentrifugiert und bis zur weiteren Aufarbeitung im Tiefkühlschrank bei -25°C eingefroren.

2. Herstellung des Acetontrockenpulvers

Die tiefgefrorenen Bakterien wurden im Wasserbad ($70 - 80^{\circ}\text{C}$)

schnell unter Umrühren aufgetaut, mit dem zehnfachen Volumen gekühlten Acetons (-25°C) gut gemischt und im vorgekühlten Homogenisator 3 x 15 Sek. lang in Aceton homogenisiert. Das Zellhomogenat wurde auf einer Büchner-Nutsche (Durchmesser 5,5 cm) durch zwei Weißbandfilter (Fa. Schleicher & Schüll) abgesaugt und dreimal mit ca. 30 ml gekühltem Aceton gewaschen. Der vom Filter abgekratzte Niederschlag wurde mit einem Glasstab pulverisiert und bei Zimmertemperatur an der Luft bis zur Acetonfreiheit getrocknet. Die weitere Trocknung des Acetontrockenpulvers erfolgte über Phosphorpentoxyd und festem Paraffin im Vakuumexsikkator (Kühlschrank). Nach ca. 12 Std. war das Material für die Enzymnachweise gebrauchsfertig.

Für die zum Nachweis der spezifischen Enzymaktivitäten hergestellten Extrakte aus den Acetontrockenpulvern ist es von Bedeutung, daß in der kalten Acetonlösung die lipoidhaltigen Zellstrukturen zerstört werden, die Proteine aber unlöslich sind, während die Zellflüssigkeit mit dem Aceton entfernt wird. Bei einer Extraktion des Acetontrockenpulvers mit gepufferten wäßrigen Lösungen gehen dann die meisten Proteine in Lösung.

3. Enzymnachweise im Acetontrockenpulver-Extrakt

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Urease und der Enzyme des Ornithin-Cyclus wurden die bei K. KLECZKOWSKI u. Mitarb. (1966b) und U. HIORT u. Mitarb. (1967) beschriebenen Methoden verwandt.

a) Bestimmung der Urease-Aktivität

Urease (Urea: Amidohydrolase EC 3.5.1.5.)

Zur Bestimmung der spezifischen Urease-Aktivität wurden zunächst zur Gewinnung des Enzymmaterials 30 mg Acetontrockenpul-

ver mit 3 ml eines 0,1 molaren Tris-SO₄-Puffers mit dem pH-Wert 8,0 5 Min. lang unter Eiskühlung extrahiert, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. In Halbmikroreagenzgläser, die in einer Wasser-Eis-Mischung standen, wurden dann als Reaktionslösung einpipettiert (J.B. SUMNER, 1955): 0,5 ml Acetonpulver-Extrakt (0,2 - 0,7 mg Eiweiß); 0,1 ml Harnstofflösung (10 μ mol Harnstoff, Fa.Merck); 0,1 ml L-Cysteinlösung (5 μ mol Cystein, Fa.Schuchardt) als SH-Gruppen-Protektor und Wasser zu 1,0 ml Gesamtvolumen. Die Reaktionsdauer betrug 30 Min. bei 37°C im Ultrathermostaten (Fa.Haake, Typ NBS). Die Blindproben enthielten keinen Harnstoff. Bei Versuchsabbruch wurden die Proben in Eiswasser gestellt und möglichst schnell zur Ammoniakbestimmung in Conway-Schalen überführt. Das freigesetzte Ammoniak, das im zentralen Borsäure-Indikator-Gefäß der Conway-Schalen absorbiert worden war, wurde durch Rücktitration mit n/100 HCl bestimmt (E.J. CONWAY u. E. O'MALLEY, 1942 sowie E.J. CONWAY, 1962).

Alle Bestimmungen (auch die der nachfolgend beschriebenen Enzymnachweise) wurden als Parallelansätze durchgeführt.

Die spezifische Aktivität der Urease unter diesen Bedingungen wurde in μ mol gespaltenen Harnstoff pro 1 mg Eiweiß berechnet (Eiweißbestimmung siehe S.19 und 102; Berechnung der spezifischen Aktivität siehe Arbeitsvorschriften, S104).

b) Bestimmung der Carbamoylphosphat-synthetase-Aktivität
Carbamoylphosphat-synthetase [ATP: Carbaminatphosphotransferase (dephosphorylierend) EC 2.7.2.5.]

Die Citrullinbildung durch den Acetonpulver-Extrakt wurde als Maß für die spezifische Aktivität der Carbamoylphosphat-synthe-

tase genommen. Für den Versuchsansatz wurden zunächst 72 mg Acetontrockenpulver mit 4 ml eines 0,1 molaren Tris-HCl-Puffers vom pH-Wert 7,6 in einem Zentrifugenglas unter Eiskühlung 5 Min. lang extrahiert. Nach 15 Min. langer Zentrifugation mit 5000 x g bei 4°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) wurde der Überstand abdekantiert. Die Reaktionslösung für jede Aktivitätsbestimmung hatte folgende Zusammensetzung (nach K. KLECZKOWSKI, 1965): 0,5 ml Acetonpulver-Extrakt (0,2 - 0,6 mg Eiweiß); 0,1 ml 0,5 molarer Tris-HCl-Puffer mit dem pH-Wert 7,6; 0,2 ml Substratlösung [enthaltend: 5 μmol Adenosin-5'-triphosphat-Na-Salz (Fa.Boehringer); 5 μmol Phosphoenol-pyruvat-K-Salz (Fa.Boehringer); 5 μmol L-Ornithin-HCl (Fa.Merck); 15 μmol Magnesiumsulfat $\cdot$ 7 H₂O (Fa. Merck) (siehe Arbeitsvorschriften, S.106)]; als N-Donator für die Carbamylphosphat-Synthese entweder 0,1 ml Glutaminlösung (20 μmol L-Glutamin, Fa.Schuchardt) oder 0,1 ml Ammoniumsulfatlösung (20 μmol (NH₄)₂SO₄, Fa.Merck); 0,1 ml Natriumbicarbonatlösung (40 μmol NaHCO₃, Fa.Merck); 0,1 ml Pyruvat-kinase-Lösung (60 Bücher-Einheiten, Fa.Boehringer); mit Wasser wurde zu 1,0 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. - Da die Ornithincarbamyl-transferase in dem zugesetzten Acetonpulver-Extrakt vorhanden ist, erübrigte sich ein Zusatz des Enzyms (siehe S.38). - Bei den Blindproben wurde zunächst der Extrakt mit der Pufferlösung zur Denaturierung des Eiweißes 5 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt; dann wurden die anderen Reagenzlösungen (außer 0,2 ml Substratlösung) zugegeben.

Nach 60 Min. Reaktionsdauer bei 37°C (Ultrathermostaten) wurde 0,1 ml Perchlorsäure zugesetzt, das ausgefällte Eiweiß abzentrifugiert und das Citrullin nach der Archibald-Methode (R.M. ARCHIBALD, 1944) bestimmt (ausführliche Darstellung der Citrul-

linbestimmung siehe Arbeitsvorschriften, S.108).

Die spezifische Aktivität der Carbamoylphosphat-synthetase wurde in μmol gebildetes Citrullin je 1 mg Eiweiß berechnet.

c) Bestimmung der Ornithincarbamoyl-transferase-Aktivität

Ornithincarbamoyl-transferase (Carbamylphosphat: L-Ornithincarbamoyl-transferase EC 2.1.3.3.)

Zur Gewinnung des Acetonpulver-Extraktes wurden 10 mg Acetontrockenpulver mit 3 ml eines 0,02 molaren Phosphat-Puffers (nach SÖRENSEN) mit dem pH-Wert 7,4 im gekühlten Zentrifugenglas 5 Min. lang extrahiert, danach 15 Min. lang mit 5000 x g bei 4°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Zum Enzymnachweis wurden zusammengegeben (nach J. CARAVACA u. S. GRISOLIA, 1960): 0,2 ml Extrakt (30 - 50 mg Eiweiß); 0,2 ml einer 0,5 molaren Diäthanolamin-Lösung²⁾, die mit Essigsäure auf den pH-Wert 8,45 gebracht worden war; 0,1 ml (20 μmol) Carbamylphosphat-diammoniumsalzlösung³⁾; 0,1 ml (20 μmol) L-Ornithin-HCl-Lösung (Fa. Merck) und deionisiertes Wasser auf 1,0 ml Gesamtvolumen. - Bei den Blindproben wurde zur Denaturierung der Enzyme der Extrakt mit der Pufferlösung 5 Min. lang im siedenden Wasserbad erhitzt und dann erst die Carbamylphosphat- und Ornithinlösung zugegeben.

²⁾ Von J. CARAVACA u. S. GRISOLIA (1960) ist für den Enzymnachweis Tris-Puffer vom pH-Wert 8,5 eingesetzt worden. Dieser ist in unseren Versuchen durch den Diäthanolamin-Puffer vom pH-Wert 8,45 [nach K. KLECKOWSKI u. P.P. COHEN (1964)] ersetzt worden. - Vorversuche ergaben weiterhin, daß die Extraktbereitung aus dem Acetontrockenpulver nicht mit dem Diäthanolamin-Puffer durchgeführt werden durfte, weil dieser bei der Eiweißbestimmung des Extraktes störte. Zur Enzymstabilisierung bei der Extraktion wurde deshalb der verdünnte 0,02 molare Phosphat-Puffer verwendet.

³⁾ Das Carbamylphosphat-diammoniumsalz wurde nach der Methode von R.L. METZENBERG u. Mitarb. (1960) präparativ dargestellt (siehe Arbeitsvorschriften, S.106).

Nach 15 Min. Reaktionsdauer bei 37°C wurde mit 0,1 ml Perchlorsäure (60%ig) das Eiweiß ausgefällt und die Proben in Eis gestellt. Das ausgefällte Eiweiß wurde abzentrifugiert und das im Reaktionsansatz synthetisierte Citrullin nach der Archibald-Methode (R.M. ARCHIBALD, 1944) quantitativ bestimmt (Citrullinbestimmung siehe Arbeitsvorschriften, S.108).

Die spezifische Aktivität der Ornithincarbamoyl-transferase wurde in μmol gebildetes Citrullin je 1 mg Eiweiß berechnet.

- d) Bestimmung der Aktivität der "argininsynthetisierenden Enzyme": Argininosuccinat-synthetase [AMP (L-Citrullin: L-Asparagin-ligase EC 6.3.4.5.); Argininosuccinase (L-Argininosuccinat: Arginin-Lyase EC 4.3.2.1.)]

Zur Gewinnung des Acetonpulver-Extraktes wurden 60 mg Aceton-trockenpulver mit 3 ml eines 0,1 molaren Phosphat-Puffers mit dem pH-Wert 7,4 5 Min. lang extrahiert (Eiswasser-Kühlung) und danach zentrifugiert. Die Reaktionslösung zum Nachweis der "argininsynthetisierenden Enzyme" war folgendermaßen zusammengesetzt (nach S. RATNER, 1955): 0,5 ml Extrakt (0,4 - 0,8 mg Eiweiß); 0,1 ml 0,5 molarer Phosphat-Puffer (pH-Wert 7,4); 0,2 ml Substratlösung [enthaltend: 5 μmol Adenosin-5'-triphosphat-Na-Salz (Fa.Boehringer); 10 μmol L-Citrullin (Fa.Serva); 10 μmol L-Asparaginsäure (Fa.Merck) und 10 μmol Magnesiumsulfat • 7 H₂O (Fa.Merck) (siehe Arbeitsvorschriften, S.105)] . - Die Blindproben wurden ohne Substratlösung 5 Min. lang im siedenden Wasserbad erhitzt. Die Reaktionszeit betrug 30 Min. bei 37°C. Danach wurde zu jeder Probe 0,1 ml Lösung des Arginasepräparates (siehe Arbeitsvorschriften, S.106) (Arginase, Fa. Sigma, 1,3 Van Slyke-Archibald-Einheiten) und 0,1 ml Ureasepräparatlösung (siehe Arbeitsvorschriften, S.106) (50 γ Urease,

Fa. Merck, 250 000 Sumner-Einheiten pro 1 g) zugefügt. Nach weiteren 30 Min. Reaktionszeit bei 37°C wurden die Proben in Eiswasser gestellt. Das gebildete Arginin konnte nach der Arginase- und Urease-Einwirkung als Ammoniak nach der Conway-Methode (siehe Arbeitsvorschriften, S.103) bestimmt werden.

Die spezifische Aktivität der "argininsynthetisierenden Enzyme" wurde in μmol abgespaltenen Harnstoff je 1 mg Eiweiß berechnet.

e) Bestimmung der Arginase-Aktivität

Arginase (L-Arginin: Ureidohydrolase EC 3.5.3.1.)

Die Arginase-Aktivität wurde nach der Methode von D.M. GREENBERG (1955), die von L. ECKERT u. Mitarb. (1966) modifiziert worden ist, bestimmt. 30 mg Acetonpulver wurden mit 3 ml deionisiertem Wasser 5 Min. lang unter Kühlung extrahiert und dann der Extrakt zentrifugiert. In die Reaktionslösung wurden gegeben: 0,5 ml Acetonpulver-Extrakt (0,2 - 0,4 mg Eiweiß); 0,2 ml eines 0,5 molaren Tris-Maleinsäure-NaOH-Puffers (nach J. STAUFF u. R. JAENICKE, 1964) mit dem pH-Wert 7,0; 0,1 ml L-Argininlösung (40 μmol L-Arginin, Fa. Schuchardt), eingestellt auf den pH-Wert 7,0; 0,1 ml Kobaltsulfatlösung (5 μmol Kobaltsulfat, Fa. Merck) und 0,1 ml Ureasepräparatlösung (siehe Arbeitsvorschriften, S.106) (50 γ Urease, Fa. Merck, 250 000 Sumner-Einheiten pro 1 g). Der Extrakt und die Pufferlösung der Blindproben wurden zur Inaktivierung der Enzyme 5 Min. lang im siedenden Wasserbad erhitzt, bevor die Arginin- und Ureaselösung zugegeben wurden. Die Reaktionsdauer betrug 30 Min. bei 37°C. Danach wurden die Proben in Eiswasser gestellt und das aus dem abgespaltenen Harnstoff gebildete Ammoniak nach der Conway-Methode bestimmt.

Die spezifische Aktivität der Arginase wurde in μmol abgespaltenen Harnstoff je 1 mg Eiweiß berechnet.

4. Eiweißbestimmung der Acetonpulver-Extrakte

Der Eiweißgehalt der Acetonpulver-Extrakte wurde nach der Methode von O.H. LOWRY u. Mitarb. (1951) mit dem Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz bestimmt. Die Extrakte wurden je nach Enzymnachweis unterschiedlich verdünnt. Für den Nachweis der Aktivität der Carbamoylphosphat-synthetase wurden 30 μl , der Ornithincarbamoyl-transferase 200 μl , der "argininsynthetisierenden Enzyme" 30 μl , der Arginase 50 μl und der Urease 50 μl Extrakt genommen. Mit Wasser wurde auf 1 ml aufgefüllt und je Probe 5 ml Eiweißreagenzlösung hinzugefügt. Danach wurde gut umgeschüttelt und 10 Min. lang stehengelassen. Jede Probe wurde dann mit 0,5 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz versetzt, gut durchgeschüttelt und nach frühestens 30 Min. die Intensität der eingetretenen Blaufärbung als Transmission bei 750 nm im Spektralphotometer gegen den Reagenzienblindwert gemessen. Alle Messungen wurden als Parallelbestimmungen durchgeführt. Aus einer Eichkurve konnte der Eiweißgehalt der Proben in γ -Mengen entnommen werden (Herstellung der Eiweißreagenzlösung und Eichkurve siehe Arbeitsvorschriften, S.102).

C. E R G E B N I S S E

I. DAS WACHSTUM VON MICROCOCCUS DENITRIFICANS AUF VERSCHIEDENEN N-QUELLEN

1. Der Einfluß verschiedener N-Quellen auf das Wachstum bei aeroben Kulturbedingungen

Für die Untersuchungen über die Beeinflussung der Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus durch verschiedene N-Quellen sollte zunächst die Wirkung der eingesetzten N-Verbindungen auf das Wachstum des Versuchsorganismus festgestellt werden.

Versuchsansatz: *M. denitrificans* wurde auf Schrägagarröhrchen (0,5% Glucose; 0,5% Kaliumnitrat; 0,5% Pepton; 1,5% Agar-Agar) 24 Std. lang vorgezogen, abgeimpft und in 85 ml sterilisiertem Leitungswasser suspendiert. 10 ml dieser Lösung dienten zur Animpfung eines Kulturkolbens, in dem als jeweils alleinige N-Quelle in der Nährlösung Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat (anorganische N-Quelle), Harnstoff, Glutamin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Alanin, Ornithin, Citrullin beziehungsweise Arginin vorhanden war. Alle N-Verbindungen wurden N-äquivalent zu Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat gegeben. Die Trübungszunahme der einzelnen Kulturen wurde stündlich im EEL-Nephelometer (siehe S.10) gegen einen Standard gemessen.

Nach den Untersuchungen von M. VOGT (1965) wächst *M. denitrificans* bei Kultur auf Ammoniumchlorid, Kaliumnitrat und Natriumglutaminat als N-Quellen sehr gut. Die in Abb.4 graphisch wiedergegebenen Untersuchungen zeigen, daß das Bakterium auch auf der rein anorganischen N-Quelle (ohne Natriumglutaminat) sehr gut wächst. Nach einer kurzen Anlaufphase setzt das Hauptwachstum ein, das schon nach 20 Std. sein Maximum erreicht. Daran schließt sich eine gleichmäßig abfallende Auslaufphase an. Wird Harnstoff als alleinige N-Quelle gegeben, so ist die Anlaufphase verlängert; die Hauptwachstumsphase erstreckt sich im Vergleich zur ersten N-Quelle über einen größeren Zeitraum. Das Maximum des Wachstums ist erst nach einer

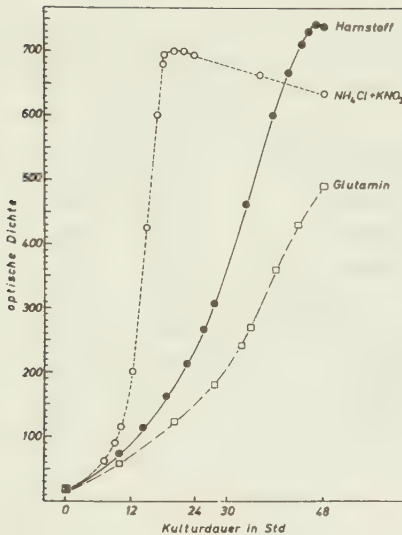


Abbildung 4: A e r o b e Kulturbedingungen: Wachstum von *M i c r o c o c c u s d e n i t r i f i c a n s* auf Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff und Glutamin als jeweils alleinige N-Quelle

Kulturdauer von 46 Std. erreicht. Bei Glutamin ist das Wachstum noch mehr verzögert. Es ist aber bemerkenswert, daß die Substanzzunahme stetig anhält. Eine Bestimmung nach 72 Std. Kulturdauer zeigt nämlich an, daß noch eine Wachstumszunahme bis zu einem Meßwert von 960 erfolgte (siehe Tab.1).

Abb.5 gibt die Kurven der optischen Dichte beim Wachstum auf Glutaminsäure, Asparaginsäure und Alanin wieder. Glutaminsäure und Asparaginsäure werden gleich gut genutzt; Alanin wird etwas schlechter verwertet. Die Anlaufphase erstreckt sich bei allen drei Aminosäuren über einen längeren Zeitraum als bei den

Tabelle 1: A e r o b e Kulturbedingungen: Optische Dichte von *M i c r o c o c c u s* - Kulturen auf verschiedenen N-Quellen nach 48 Std. und 72 Std. Kulturdauer

N-Quelle	Trübungsmeßwert nach	
	48 Std.	72 Std.
Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat	635	580
Harnstoff	735	605
Glutamin	480	960
Glutaminsäure	490	1200
Asparaginsäure	490	980
Alanin	390	805
Ornithin	100	780
Citrullin	160	430
Arginin	480	600

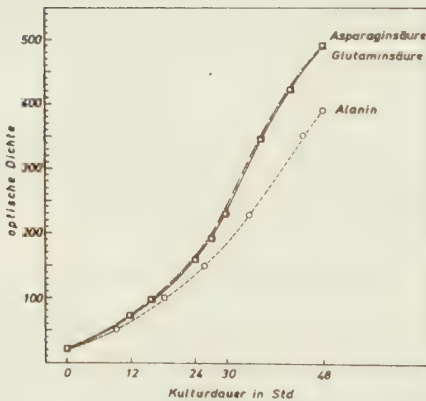


Abbildung 5: A e r o b e Kulturbedingungen: Wachstum von *M i c r o c o c c u s d e n i t r i f i c a n s* auf Glutaminsäure, Asparaginsäure und Alanin als jeweils alleinige N-Quelle

in Abb.4 wiedergegebenen N-Quellen Harnstoff und Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat. Wie Tab.1 ergänzend zeigt, hält das Wachstum auf diesen N-Verbindungen noch längere Zeit an: Nach 72 Std. wurden bei Glutaminsäure noch Werte von 1200, bei Asparaginsäure von 980 und bei Alanin von 805 gemessen. Es fällt auf, daß die Zellvermehrung gegenüber der auf der anorganischen N-Quelle (Abb.4) verzögert ist.

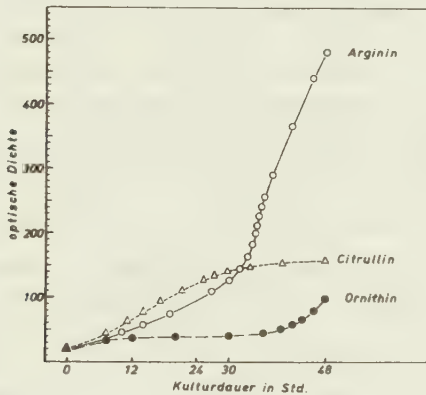


Abbildung 6: A e r o b e Kulturbedingungen: Wachstum von *M i c r o c o c c u s d e n i t r i f i c a n s* auf Ornithin, Citrullin und Arginin als jeweils alleinige N-Quelle

In der Abb.6 sind die Untersuchungsergebnisse über das Wachstum von *M. d e n i t r i f i c a n s* bei der Verwendung der Aminosäuren des Ornithin-Cyclus als N-Quellen graphisch dargestellt worden. Ornithin und Citrullin werden weniger gut als die vorher geprüften N-Verbindungen zur Zellvermehrung genutzt. Es ist eine lange Anlaufphase vorhanden. Die Substanzvermehrung erfolgt im Verlaufe der Kulturdauer nur langsam. Lediglich auf

Arginin ist etwa ab der 30. Std. der Kulturdauer eine starke Substanzvermehrung festzustellen. Nach 72 Std. (siehe Tab.1) wurde für die Ornithin-N-Quelle ein Trübungsmeßwert von 780 und für Citrullin von 430 festgestellt.

Zusammenfassend läßt sich sagen (betrachtet man den uns für die folgenden enzymatischen Untersuchungen interessierenden Zeitraum von 48 Std.), daß die N-Quellen Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat und Harnstoff ein sehr gutes, Glutamin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Alanin und Arginin ein gutes und Citrullin und Ornithin nur ein geringes Wachstum ermöglichen.

2. Der Einfluß verschiedener N-Quellen auf das Wachstum bei anaeroben Kulturbedingungen

Die Ergebnisse der Wachstumsversuche unter *a n a e r o b e n* Kulturbedingungen (Versuchsansätze wie zuvor, jedoch Begasung während der Kulturdauer mit einem Gemisch aus 85% N_2 und 15% CO_2) sind insgesamt in Abb.7 zusammengefaßt worden. Eine Substanzzunahme erfolgt nur in dem Nährmedium mit der anorganischen N-Quelle. Offensichtlich ist hierfür das Nitrat verantwortlich, das als Wasserstoffakzeptor eine Energiegewinnung unter *a n a e r o b e n* Kulturbedingungen ermöglicht. - Für die weiter unten beschriebenen Versuche über die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus unter *a n a e r o b e n* Kulturbedingungen (siehe S.30 ff) ergibt sich hieraus, daß die Nährmedien mit den organischen N-Quellen mit einer größeren Menge vorgezogenen Bakterienmaterials beschickt werden mußten, um genügend Untersuchungsmaterial für die Analysen über den Einfluß dieser N-Verbindungen zu haben.

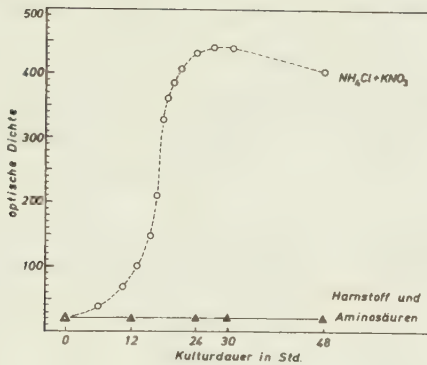


Abbildung 7: Anaerobe Kulturbedingungen: Wachstum von *Micrococcus denitrificans* auf Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff, Glutamin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Alanin, Ornithin, Citrullin und Arginin als jeweils alleinige N-Quelle

3. Änderungen des pH-Wertes während des Wachstums unter verschiedenen Kulturbedingungen

Gleichzeitig mit den Trübungsmessungen wurde sowohl in den Kulturen unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen in Abständen von 6 Std. die Wasserstoffionenkonzentration gemessen. Die Ergebnisse sind in Tab.2 zusammengefaßt worden. Nur bei der N-Quelle Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat tritt unter beiden Kulturbedingungen eine Änderung des pH-Wertes ein, wobei unter aeroben Bedingungen die Verschiebung in den alkalischen Bereich hinein stärker ist. In den unter aeroben Bedingungen gewachsenen Kulturen dürfte der starke pH-Anstieg sogar ein begrenzender Wachstumsfaktor sein (vgl. auch Abb.4, S.21), da von M. VOGT (1965) für diesen Organismus ein pH-Optimum von 7,5 ermittelt wurde. Bei allen anderen N-Quellen

ändert sich der pH-Wert des Kulturmediums nicht.

Tabelle 2: A e r o b e und a n a e r o b e Kulturbedingungen:
 Änderungen des pH-Wertes des Kulturmediums während des Wachstums von *M i c r o c o c c u s d e n i t r i f i c a n s* auf verschiedenen N-Quellen

Kultur- dauer Std.	Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat aerob pH-Wert	Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat anaerob pH-Wert	Harnstoff, Glutamin und Aminosäuren aerob und anaerob pH-Wert
0	7,0	7,0	7,0
6	7,0	7,0	7,0
12	7,0	7,0	7,0
18	7,3	7,2	7,0
24	7,8	7,3	7,0
30	8,0	7,5	7,0
36	8,2	7,6	7,0
42	8,5	7,7	7,0
48	8,7	7,8	7,0

4. Eiweißsynthese während des Wachstums unter verschiedenen Kulturbedingungen

Da die Bestimmungen der spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus mit dem Extrakt des Acetontrockenpulvers durchgeführt werden sollten, interessierte noch, inwiefern quantitative Änderungen des Eiweißgehaltes des Acetontrockenpulver-Extraktes durch die verschiedenen N-Quellen unter den a e r o b e n und a n a e r o b e n Kulturbedingungen bewirkt werden. Hierzu wurden mittels der Methode nach O.H. LOWRY u. Mitarb. (1951) (siehe Arbeitsvorschriften, S.102) die wasserlöslichen Eiweißanteile aus jeweils 5 mg Acetontrockenpulver bestimmt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tab.3 zusammengefaßt worden. Die N-Quellen Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff und Glutamin (Substanzen, die leicht Ammonium-Ionen liefern) bewirken unter a e r o b e n Kulturbedingungen hohe Eiweißwerte

im Acetonpulver-Extrakt. Der größte Eiweißwert wurde beim Wachstum auf der anorganischen N-Quelle und auf Harnstoff nach 30 Std. und für Glutamin nach 48 Std. Kulturdauer gefunden. Bei allen anderen N-Quellen ist die Synthese dieses wasserlöslichen Eiweißes wesentlich geringer. Hervorzuheben ist noch die Wirkung von Ornithin, das ab 30 Std. Kulturdauer die Eiweißsynthese von 216 μ auf 458 μ steigert.

Tabelle 3: A e r o b e Kulturbedingungen: Der Einfluß verschiedener N-Quellen auf den Eiweißgehalt im Wasserextrakt des Acetontrockenpulvers von *Micrococcus denitrificans* in Abhängigkeit von der Kulturdauer

N-Quelle	wasserlösliches Eiweiß aus 5 mg Acetontrockenpulver in μ			
	12 Std.	24 Std.	30 Std.	48 Std.
Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat	327	347	527	501
Harnstoff	567	616	725	675
Glutamin	195	295	570	590
Asparaginsäure	220	285	375	360
Glutaminsäure	240	355	265	250
Alanin	375	375	415	400
Ornithin	234	250	216	458
Citrullin	165	165	190	200
Arginin	248	340	340	345

In den unter a n a e r o b e n Bedingungen aufgewachsenen Kulturen (Tab.4) liegen die Eiweißgehalte wesentlich niedriger. Beim Wachstum auf der anorganischen N-Quelle ist die Synthese des wasserlöslichen Eiweißes noch gering gefördert, während auf Harnstoff, Glutamin und Ornithin der Gehalt bei Versuchsabbruch niedriger als im Acetonpulver-Extrakt der jungen Kulturen ist. Bei allen anderen N-Quellen bleibt der wasserlösliche Eiweißgehalt, sieht man von geringfügigen Schwankungen ab, während der

Kulturdauer gleich, oder ist in den 24- und 30 Std. alten Kulturen gering erhöht.

Tabelle 4: A n a e r o b e Kulturbedingungen: Der Einfluß verschiedener N-Quellen auf den Eiweißgehalt im Wasserextrakt des Acetontrockenpulvers von *M i c r o c o c c u s d e n i t r i f i c a n s* in Abhängigkeit von der Kulturdauer

N-Quelle	wasserlösliches Eiweiß aus 5 mg Acetontrockenpulver in γ			
	12 Std.	24 Std.	30 Std.	48 Std.
Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat	290	315	325	315
Harnstoff	205	180	140	155
Glutamin	210	180	155	160
Asparaginsäure	130	140	135	150
Glutaminsäure	115	140	140	125
Alanin	125	120	110	130
Ornithin	175	170	160	145
Citrullin	115	140	135	115
Arginin	140	140	155	155

II. DIE SPEZIFISCHEN AKTIVITÄTEN DER ENZYME DES ORNITHIN-
CYCLUS VON M I C R O C O C C U S D E N I T R I F I -
C A N S IN ABHÄNGIGKEIT VON DER N-QUELLE UND KULTUR-
DAUER

Die folgenden Versuchsreihen sollten Auskunft darüber geben, wie sich die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus beim Wachstum auf verschiedenen N-Quellen verhalten. Hierzu wurde der Versuchsorganismus in Nährlösungen gezogen, die

1. Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff oder Glutamin (=Gruppe der anorganischen N-Quellen beziehungsweise solcher, aus denen leicht Ammonium freigesetzt wird)
2. Glutaminsäure, Asparaginsäure oder Alanin (=Gruppe der Grundamino-säuren)
3. Ornithin, Citrullin oder Arginin (=Gruppe der Amino-säuren des Ornithin-Cyclus)

als jeweils alleinige N-Quelle enthielten. Alle N-Quellen wurden N-äquivalent zu 0,1% Ammoniumchlorid + 0,5% Kaliumnitrat gegeben. Der Einfluß jeder N-Verbindung auf die Enzymbildung wurde unter a e r o b e n und a n a e r o b e n Kulturbedingungen geprüft.

1. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-
Cyclus nach Wachstum auf Ammoniumchlorid + Kaliumni-
trat, Harnstoff und Glutamin

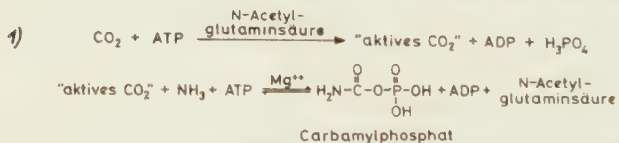
Versuchsansätze: Für die Kulturen unter a e r o b e n Bedingungen wurde M. d e n i t r i f i c a n s 24 Std. lang auf Schrägagar (enthaltend: 0,5% Glucose, 0,5% Kaliumnitrat, 0,5% Pepton, 1,5% Agar-Agar) vorgezogen und dann eine homogene Suspension in eine Nährlösung mit Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff beziehungsweise Glutamin übertragen. Die spezifische Aktivität der Enzyme zum Zeitpunkt 0 (=Zeitpunkt der Animpfung) wurde in vier Parallelbestimmungen ermittelt, wobei für jede Analyse 24 Schrägagar-Kulturen (Alter 24 Std.) verwandt wurden. Der in den Abbildungen angegebene Wert ist der Mittelwert aus den vier Analysen. Die Differenz

der Einzelbestimmungen betrug $\pm 14\%$.

Da unter anaeroben Kulturbedingungen M. denitrificans nur auf der anorganischen N-Quelle (Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat) zu wachsen vermag (siehe Abb. 7, S. 25), wurde für die entsprechenden Versuche mit Harnstoff und Glutamin zunächst eine Bakterienkultur unter aeroben Bedingungen (Nährlösung: 0,5% Glucose, 0,5% Kaliumnitrat, 0,5% Pepton; siehe Methodenteil, S. 10) vorgezogen, die Bakterienmasse nach 24 Std. Kulturdauer abzentrifugiert und dann insgesamt auf die neuen Nährmedien übergeimpft. Mit dieser vorgezogenen Bakterienmasse konnten auch unter anaeroben Bedingungen - obwohl kein Wachstum erfolgt - Einflüsse der N-Quellen auf die getesteten Enzymaktivitäten festgestellt werden⁴⁾.

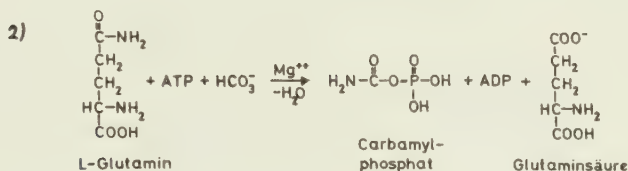
Die Analysen erfolgten nach 0, 12, 24, 30 und 48 Std. Kulturdauer (vgl. für diese Zeitwahl die Wachstumskurven Abb. 4 bis 7). Die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Enzyme wurde mit Aceton-trockenpulver-Präparaten durchgeführt. Alle Werte sind aus Parallelanalysen gemittelt worden.

Carbamoylphosphat-synthetase: Neben der Carbamat-kinase, die die Bildung von Carbamylphosphat aus HCO_3^- , NH_4^+ und ATP (mit Mg^{++} als Cofaktor) katalysiert (siehe M.E. JONES u. Mitarb., 1955; L.C. MOKRASCH u. Mitarb., 1960; J.M. RAVEL u. Mitarb., 1961), sind noch zwei Carbamoylphosphat-synthetasen bekannt, von denen die eine Ammoniak (siehe Reaktionsformel 1) und die



⁴⁾ Die spezifischen Enzymaktivitäten zum Zeitpunkt 0 haben bei den anaeroben Ansätzen häufig wesentlich verschiedene Werte (siehe Abb. 10, 11 und andere mehr). Das ist darauf zurückzuführen, daß die Versuchsreihe mit der anorganischen N-Quelle unmittelbar mit Bakterienmaterial angeimpft wurde, das von Schrägagarröhrchen entnommen wurde. Für die Ansätze mit Harnstoff und Glutamin hingegen wurde der Organismus zunächst in Submerskultur (mit 0,5% Glucose, 0,5% Kaliumnitrat, 0,5% Pepton) kultiviert, und dann erst die vorgezogene Bakterienmasse auf die neuen Nährmedien "umgepflanzt". Die verschiedene Anzucht bedingt also die unterschiedlichen Enzymaktivitäten zum Versuchsbeginn (=Zeitpunkt 0). Dies muß bei der Interpretation der Aktivitätskurven berücksichtigt werden.

andere L-Glutamin (siehe Reaktionsformel 2) als N-Donator benötigt:



Die Carbamoylphosphat-synthetase, die die nach Gleichung 1 ablaufende Reaktion katalysiert, kommt vornehmlich im Tierreich, jedoch auch in höheren Pflanzen vor (siehe R.L. METZENBERG u. Mitarb., 1958; G.W. BROWN u. P.P. COHEN, 1959), während die nach Gleichung 2 erfolgende Synthese von Carbamylphosphat bisher nur in Mikroorganismen, höheren Pilzen und höheren Pflanzen gefunden wurde (siehe B. LEVENBERG, 1962; K. KLECZKOWSKI, 1965; F. LACROUTE u. Mitarb., 1965; L. ECKERT u. Mitarb., 1966).

Die folgenden Versuche sollten klären, ob M. d e n i t r i f i c a n s die Synthese von Carbamylphosphat mit Ammoniak und/oder L-Glutamin als N-Donator durchführt. Hierzu wurde die spezifische Aktivität des Enzyms zunächst nach Wachstum des Organismus im Nährmedium mit Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff beziehungsweise Glutamin als N-Quellen in Abhängigkeit von der Kulturdauer unter a e r o b e n und a n a e r o b e n Bedingungen gemessen, wobei für die enzymatischen Versuchsansätze als N-Donator Ammonium oder L-Glutamin verwandt wurde.

V e r s u c h e u n t e r a e r o b e n K u l t u r b e d i n g u n g e n: Die spezifischen Aktivitäten des Enzyms

sind in den Abbildungen 8 (Ansatz der enzymatischen Testlösung mit Ammonium als N-Donator) und 9 (L-Glutamin als N-Donator) wiedergegeben worden.

A m m o n i u m a l s N - D o n a t o r: Bei a e r o b e r Kultur auf Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat und auf Harnstoff steigt die spezifische Aktivität in der jungen Kultur stetig an, wobei allerdings die anorganische N-Quelle nach 24 stündiger Kulturdauer eine etwa doppelt so hohe Enzymaktivität bewirkt. Nach 30 Std. Kulturdauer tritt ein Abfall der Enzymaktivität ein. Danach steigt dann die Aktivität bis zum Versuchsabbruch wieder an. - Ein Vergleich mit den Wachstumskurven (siehe Abb.4, S.21) zeigt, daß die starke Wachstumsintensität zu Kulturbeginn auf der anorganischen N-Quelle gekoppelt ist mit einer besonders hohen spezifischen Aktivität der Carbamoylphosphat-synthetase, des Enzyms also, das den Ammoniumstickstoff in den Ornithin-Cyclus einschleust.

Glutamin als N-Quelle wirkt zunächst hemmend auf die Bildung der mit Ammonium wirksamen Carbamoylphosphat-synthetase (siehe bis 30 Std.). In der älteren Kultur steigt die spezifische Enzymaktivität an und beträgt bei Abbruch des Versuches etwa das Dreifache des zum Zeitpunkt 0 gemessenen Wertes. Ein unmittelbarer Zusammenhang mit der Wachstumskurve (Abb.4) läßt sich nicht ableiten.

G l u t a m i n a l s N - D o n a t o r (Abb.9): Auf Harnstoff als N-Quelle erreicht die spezifische Aktivität der Carbamoylphosphat-synthetase bei stetigem Anstieg nach 48 Std. Kulturdauer den etwa fünffachen Wert gegenüber der zu Beginn der Versuchsreihe gemessenen Aktivität. Beim Wachstum auf Glutamin

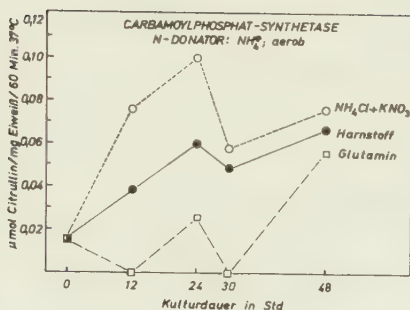


Abbildung 8: A e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff und Glutamin auf die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase von *Micrococcus denitrificans* mit Ammoniumsulfat als N-Donator im enzymatischen Versuchsansatz

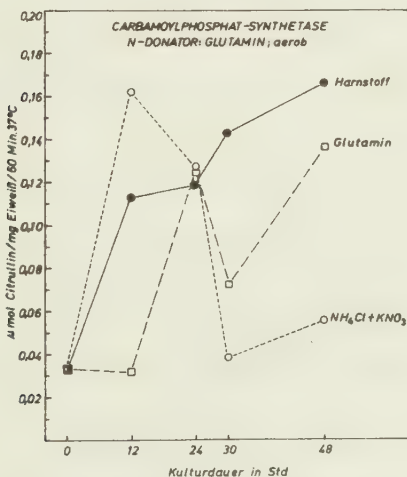


Abbildung 9: A e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff und Glutamin auf die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase von *Micrococcus denitrificans* mit Glutamin als N-Donator im enzymatischen Versuchsansatz

schwankt die Höhe der spezifischen Aktivität im Verlaufe der Kulturdauer stark: Ein gleichbleibender Wert nach 12 Std., ein starker Anstieg zum Erntezeitpunkt 24 Std., ein Absinken der Aktivität nach 30 Std. und wiederum ein Anstieg auf das etwa Vierfache (gegenüber dem Wert zu Beginn der Kultur) bei Versuchsabbruch. Wird der Versuchsorganismus auf der anorganischen N-Quelle kultiviert, so steigt die spezifische Aktivität des Enzyms innerhalb der ersten 12 Std. ca. auf das Fünffache an, sinkt dann aber steil bis zur Ausgangsaktivität ab (30 Std.) und wird danach nur geringfügig höher.

Die in den Abbildungen 8 und 9 wiedergegebenen Analysen zeigen, daß *M. denitrificans* sowohl mit Ammonium als auch mit L-Glutamin Carbamylphosphat synthetisiert. Allerdings wird durch das Wachstum auf den drei gebotenen N-Quellen die Syntheserate dieser Verbindung unterschiedlich beeinflusst: Anzucht auf Harnstoff fördert gleichsinnig die Bildung von Carbamylphosphat mit beiden N-Donatoren. Auf der N-Quelle Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat wird die Synthese von Carbamylphosphat mit Ammonium als N-Donator gefördert, beim Wachstum auf Glutamin hingegen zu Beginn der Kultur stark gehemmt. Die Bildung von Carbamylphosphat mit Glutamin als N-Donator wird umgekehrt durch Wachstum auf Glutamin stärker gefördert, während sie auf der anorganischen N-Quelle nur in den ersten Stunden der Kultur zunimmt; mit fortschreitender Kulturdauer liegt bei der letztgenannten N-Quelle jedoch eine deutliche Hemmung der Carbamylphosphat-Synthese vor.

Die unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten der Carbamoylphosphat-synthetase, die nicht nur in Abhängigkeit von der Auf-

zucht auf den verschiedenen N-Quellen stehen, sondern auch wechseln, wenn man einmal Ammonium und zum anderen Glutamin als N-Donator im enzymatischen Reaktionsgemisch einsetzt, machen es wahrscheinlich, daß zwei multiple Formen des Enzyms (über "differente" und "multiple" Formen von Enzymen siehe T. WIELAND u. G. PFLEIDERER, 1962) vorliegen. Wenn nämlich nur eine unspezifische Carbamoylphosphat-synthetase vorliegen würde, so müßten die spezifischen Aktivitäten in allen Ansätzen mit Ammonium und Glutamin als N-Donator zueinander im gleichen Verhältnis stehen. Das ist aber nicht der Fall. Die wechselnden Aktivitäten bei Einsatz der beiden N-Donatoren zeigen an, daß einmal die Synthese des mit Ammonium wirksamen Enzyms und einmal die Bildung des mit Glutamin wirksamen Enzyms durch die verschiedenen Nährmedien gefördert ist. - Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um diese vorläufigen Schlußfolgerungen zu bestätigen.

Versuche unter anaeroben Kulturbedingungen: Wächst *N. denitrificans* unter anaeroben Bedingungen auf den gleichen N-Quellen auf, so wird nur auf Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat die Synthese der Carbamoylphosphat-synthetase gefördert (siehe Abb. 10 und 11). Hierbei ist es bemerkenswert, daß das Enzym, das die Bildung von Carbamylphosphat mit Ammoniak als N-Donator katalysiert (Abb. 10) etwa die doppelt hohe spezifische Aktivität aufweist, wie das Enzym, das die Synthese mit L-Glutamin bewirkt (Abb. 11). - Auf dem Harnstoffmedium nimmt die Synthese beider Enzyme (sieht man von geringen Schwankungen der Aktivitätskurve ab) stetig ab; nach 48 Std. Kulturdauer konnte

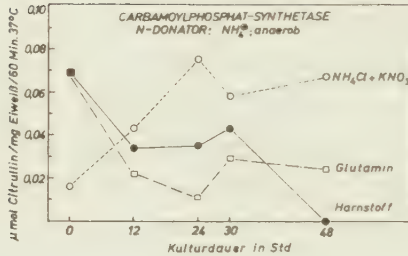


Abbildung 10: Anaerobe Kulturbedingungen: Einfluß von Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff und Glutamin auf die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase von *Micrococcus denitrificans* mit Ammoniumsulfat als N-Donator im enzymatischen Versuchsansatz

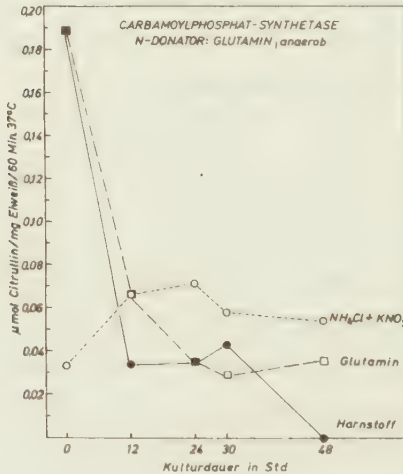


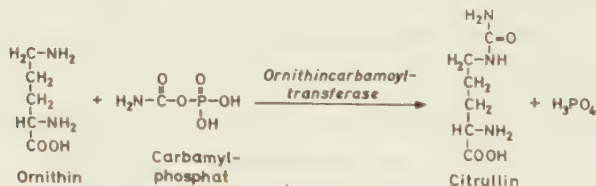
Abbildung 11: Anaerobe Kulturbedingungen: Einfluß von Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff und Glutamin auf die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase von *Micrococcus denitrificans* mit Glutamin als N-Donator im enzymatischen Versuchsansatz

keine Aktivität mehr nachgewiesen werden. Auch bei Glutamin als N-Quelle wird die Bildung der Enzyme (im Vergleich zur anorganischen N-Quelle) gehemmt, jedoch ist zu jedem Analysenzeitpunkt noch eine deutlich meßbare Aktivität in beiden Versuchsreihen vorhanden.

Die Ergebnisse der in den Abbildungen 8 - 11 wiedergegebenen Analysen lassen sich dahingehend zusammenfassen, daß unter *aeroben* Kulturbedingungen auf Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff und Glutamin als jeweils alleinige N-Quelle - wenn auch in unterschiedlicher Stärke und unter z.T. erheblichen Aktivitätsschwankungen - eine Synthese von Carbamylphosphat sowohl mit Ammoniak als auch mit Glutamin als N-Donator stattfindet. Unter *anaeroben* Kulturbedingungen hingegen wird nur auf der anorganischen N-Quelle die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase gefördert; bei Glutamin ist eine deutliche, im Verlaufe der Kulturdauer etwa gleichbleibende spezifische Aktivität nachweisbar, während auf Harnstoff bei Versuchsabbruch eine vollständige Hemmung der Enzymbildung vorliegt. Aus der Beeinflussung der spezifischen Aktivität durch die verschiedenen Wachstumsbedingungen im Zusammenhang mit der Synthese des Carbamylphosphats mittels der N-Donatoren Ammoniak beziehungsweise Glutamin wird auf zwei multiple Carbamoylphosphat-synthetasen geschlossen. - Es hat den Anschein, daß nur bei Gegenwart von molekularem Sauerstoff (*aerobe* Kulturbedingungen) beziehungsweise von Nitrat-Ionen bei *anaeroben* Kulturbedingungen, also immer dann, wenn dem denitrifizierenden Bakterium eine Energiegewinnung möglich ist (vgl. hierzu A.J. KLUYVER u. W. VERHOEVEN, 1954a, b; J.P. CHANG

u. J.G. MORRIS, 1962; H. KALTWASSER u. Mitarb., 1962; M. VOGT, 1965), eine Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase stattfindet. Es muß offen bleiben, ob die Hemmung der Synthese der Carbamoylphosphat-synthetase durch Harnstoff (beziehungsweise auch Glutamin) unter anaeroben Kulturbedingungen nur auf den Mangel an Wasserstoffakzeptoren - und damit den Mangel an Energiegewinnung - zurückzuführen ist, oder ob nicht oxydative Reaktionsschritte, die eventuell zu ihrer Bildung notwendig sind, auch eine Rolle spielen.

Ornithincarbamoyl-transferase: Das Enzym Ornithincarbamoyl-transferase katalysiert die Bildung von Citrullin aus Carbamylphosphat und Ornithin nach folgender Reaktionsgleichung (siehe u.a. M.E. JONES u. Mitarb., 1955; K. KLECZKOWSKI, 1957; G. REUTER, 1959; G.W. BROWN u. P.P. COHEN, 1959; I. REIFER u. K. KLECZKOWSKI, 1960):



Die Beeinflussung der spezifischen Aktivität der Ornithincarbamoyl-transferase im Verlaufe der Kulturdauer durch die gebotenen N-Quellen ist in den Abbildungen 12 (aerobe Bedingungen) und 13 (anaerobe Bedingungen) wiedergegeben worden.

Unter aeroben Bedingungen nimmt die Synthese des Enzyms beim Wachstum auf Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat in den ersten 24 Std. der Kulturdauer zu (spez.Akt. etwa 1,6 zu Beginn der Kultur und etwa 2,5 nach 24 Std.) und sinkt dann von diesem Zeitpunkt an stetig bis zum Abbruch des Versuches ab (48 Std. Kulturdauer: spez.Akt. rund 1,15). Wird Glutamin als N-

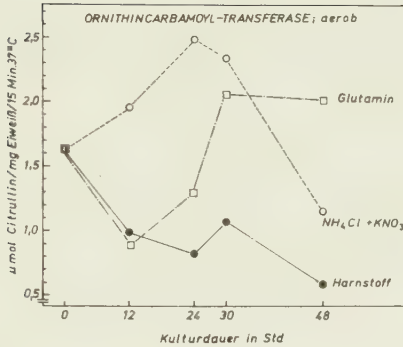


Abbildung 12: A e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff und Glutamin auf die Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase von *Micrococcus denitrificans*

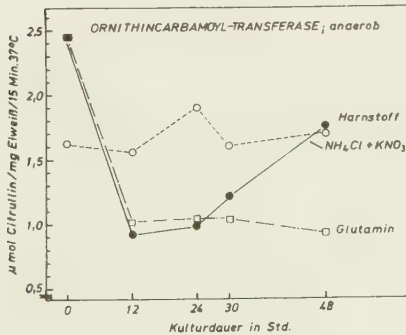


Abbildung 13: A n a e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff und Glutamin auf die Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase von *Micrococcus denitrificans*

Quelle geboten, so tritt zunächst eine Hemmung (siehe 12 Std.) und dann ein Anstieg der spezifischen Enzymaktivität auf etwas über 2,0 (30 Std.) ein. Ganz anders verhält sich der Organismus beim Wachstum auf Harnstoff: Die Enzymsynthese nimmt während der Kulturdauer, sieht man von geringen Schwankungen ab, stetig ab (spez.Akt.ca. 0,6 nach 48 Std.).

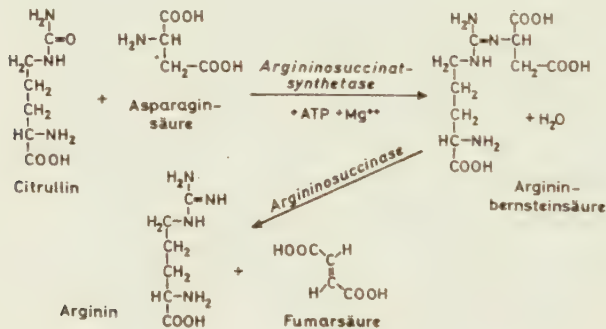
Unter *a n a e r o b e n* Kulturbedingungen nimmt die spezifische Aktivität der Ornithincarbamoyl-transferase in dem Glutamin-Nährmedium von 2,45 (zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns) auf ca. 1,0 ab (12 Std.). Während der weiteren Versuchsdauer bleibt dieser Wert praktisch unverändert. Die anorganische N-Quelle bewirkt keine signifikante Änderung der spezifischen Aktivität während der Kulturdauer (spez.Akt.ca. 1,6). Beim Wachstum auf Harnstoff verläuft die Aktivitätskurve in den ersten 24 Std. der Kultur in gleicher Weise wie bei der Glutamin-Kultur, steigt dann jedoch auf den Wert an, der beim Wachstum auf der anorganischen N-Quelle gefunden wurde (siehe 48 Std.).

Wiederum liegt, wenn auch anders als bei der Synthese der Carbamoylphosphat-synthetase, ein Einfluß auf die Bildung der Ornithincarbamoyl-transferase durch die *a e r o b e n* und *a n a e r o b e n* Kulturbedingungen vor: Bemerkenswert ist, daß Harnstoff unter *a e r o b e n* Bedingungen ein Inhibitor der Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase ist. Unter *a n a e r o b e n* Bedingungen hingegen nimmt die Bildung der Ornithincarbamoyl-transferase beim Wachstum des Organismus auf Harnstoff ab 24 Std. Kulturdauer stetig zu. Beachtung verdient fernerhin der Befund, daß beim Wachstum von *M. d e n i t r i*-

f i c a n s auf der anorganischen N-Quelle unter *a n a e-*
r o b e n Kulturbedingungen die Synthese dieses Enzyms nicht
wie die der Carbamoylphosphat-synthetase (vgl. Abb.10, 11 und
13) gefördert wird. - Diese beiden letzteren Befunde zeigen
an, daß nicht nur die mangelnde Energiegewinnung bei *M. d e-*
n i t r i f i c a n s für die Hemmung der Enzymsynthese un-
ter *a n a e r o b e n* Bedingungen eine Rolle spielt: Es wird
nämlich beim Wachstum des Organismus auf Ammoniumchlorid + Ka-
liumnitrat wohl die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase,
nicht aber die der Ornithincarbamoyl-transferase gefördert, ob-
wohl durch Reduktion des Nitrates Energie zur Verfügung steht.
Es ist weiterhin von Interesse, daß sich *M. d e n i t r i f i-*
c a n s auch unter *a e r o b e n* Wachstumsbedingungen hin-
sichtlich der Bildung der Ornithincarbamoyl-transferase teil-
weise anders verhält als z.B. die Hefen *E n d o m y c o p-*
s i s v e r n a l i s und *T o r u l o p s i s u t i l i s*
(siehe L. ECKERT, 1968): Beide Hefen steigern wie *M. d e n i-*
t r i f i c a n s im Verlaufe der Kulturdauer auf der Ammo-
nium-N-Quelle die Synthese des Enzyms; auf Harnstoff als N-
Quelle hingegen wird bei *E n d o m y c o p s i s v e r n a-*
l i s die Enzymbildung gefördert, bei *T o r u l o p s i s*
u t i l i s bleibt sie praktisch unverändert, während sie bei
M. d e n i t r i f i c a n s stark gehemmt wird. - Es muß
weiterführenden Untersuchungen vorbehalten bleiben zu prüfen,
ob für diese unterschiedliche Harnstoffwirkung möglicherweise
die Urease eine Rolle spielt: *E n d o m y c o p s i s* besitzt
nämlich eine konstitutive Urease, *T o r u l o p s i s* ist ure-
asefrei, während *M. d e n i t r i f i c a n s* auf Harnstoff-

medium eine Urease erst synthetisiert, so daß möglicherweise deren Bildung mit der Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase konkurriert.

"Argininsynthetisierende Enzyme": Das unter dem Begriff "argininsynthetisierende Enzyme" bekannte System katalysiert die Bildung von Arginin nach folgendem Reaktionsschema (vgl. S. RATNER u. B. PETRACK, 1951; J.B. WALKER, 1952; D.C. DAVISON u. W.H. ELLIOT, 1952; S. BURACZEWSKI u. Mitarb., 1960): Die Argininosuccinat-synthetase katalysiert zunächst die Bildung der Argininbernsteinsäure aus Citrullin und Asparaginsäure; die Argininosuccinase spaltet dann die Argininbernsteinsäure in Arginin und Fumarsäure.



Die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten beider Enzyme wurde in einem Ansatz durchgeführt (siehe Methoden, S.17).

Die Abbildungen 14 (aerobe Kulturbedingungen) und 15 (anaerobe Kulturbedingungen) geben die Beeinflussung des Enzymsystems durch die drei verwandten N-Quellen wieder. Zum Zeitpunkt der Animpfung beziehungsweise Umpflanzung liegen die spezifischen Aktivitäten der "argininsynthetisierenden Enzyme" sowohl in den Kulturen unter a e r o b e n als auch a n a e r o b e n Bedingungen sehr hoch. Unter a e r o b e n Bedingungen (Abb. 14) sinkt in den einzelnen Versuchsansätzen in den ersten 12

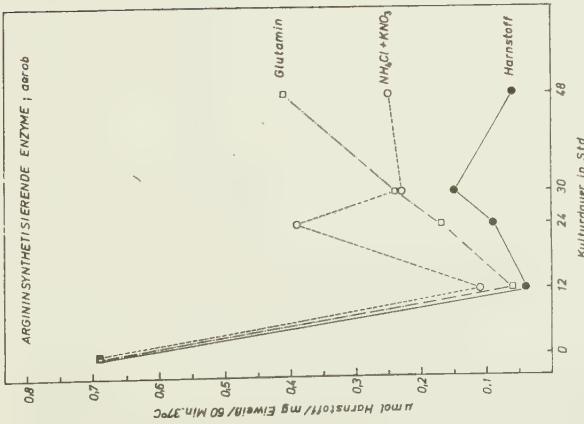


Abbildung 14: Aerobe Kulturbedingungen: Einfluß von Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff und Glutamin auf die Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme" von *Micrococcus denitrificans*.

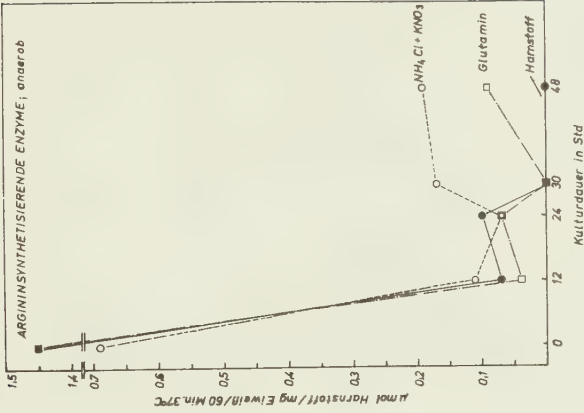


Abbildung 15: Anaerobe Kulturbedingungen: Einfluß von Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff und Glutamin auf die Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme" von *Micrococcus denitrificans*.

Std. der Kulturdauer die spezifische Aktivität von rund 0,7 auf 0,03 - 0,11. Auf Glutamin wird die Synthese des Enzymsystems im Verlaufe der weiteren Kulturdauer stetig bis auf das Siebenfache (48 Std.) gesteigert. Auf der anorganischen N-Quelle und auf Harnstoff verläuft die Aktivitätskurve anders: Die erstgenannte N-Quelle bewirkt zunächst (24 Std.) eine Förderung der Enzymsynthese um das Dreieinhalbfache. Im weiteren Verlaufe der Kultur sinkt aber die spezifische Aktivität. Auf Harnstoff wird das Maximum der Synthese nach 30 Std. Kulturdauer (dreifache Steigerung) erreicht. Danach nimmt die Enzymbildung ab.

Ein Vergleich der Kurven der spezifischen Aktivitäten mit den entsprechenden Wachstumskurven (vgl. Abb.4) zeigt eine annähernde Parallelität zwischen der Zellvermehrung und Enzymsynthese.

Unter **a n a e r o b e n** Kulturbedingungen sinkt ebenfalls in den ersten 12 Std. der Kulturdauer die spezifische Aktivität der "argininsynthetisierenden Enzyme" rasch auf den Wert von etwa 0,03 - 0,11 ab. Nach 30 Std. ist die Enzymsynthese auf dem Harnstoffmedium vollständig gehemmt. Auf Glutamin beträgt die spezifische Aktivität nach erheblichen Schwankungen zum Zeitpunkt 48 Std. das etwa Zweieinhalbfache des Wertes nach 12 Std. Die anorganische N-Quelle bewirkt eine Förderung der spezifischen Aktivität auf ca. 0,19. - Es liegen hiermit annähernd die gleichen Verhältnisse vor, wie sie bei der Beeinflussung der Carbamoylphosphat-synthetase durch diese N-Quellen herausgestellt worden sind.

Arginase: Die Spaltung des Arginins in Ornithin und Harnstoff wird unter Mitwirkung von Mn^{++} - oder Co^{++} -Ionen durch das En-

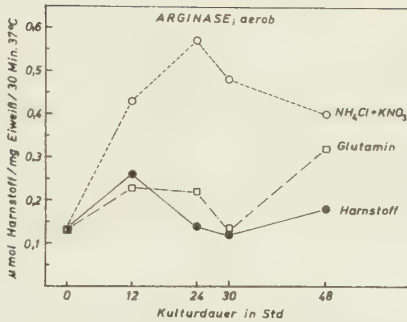


Abbildung 16: A e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff und Glutamin auf die Synthese der Arginase von *Micrococcus denitrificans*

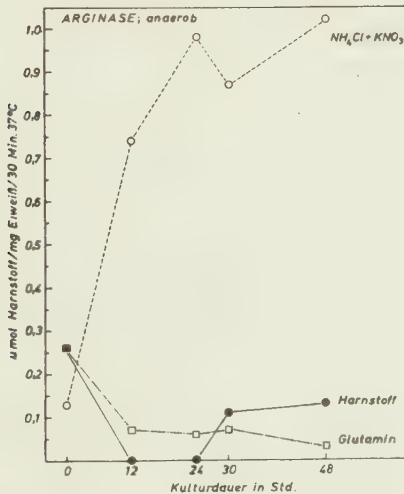
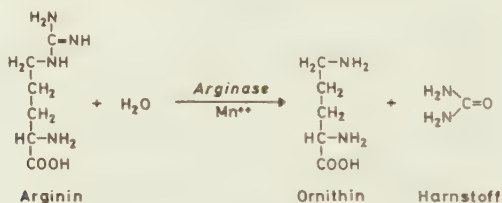


Abbildung 17: A n a e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff und Glutamin auf die Synthese der Arginase von *Micrococcus denitrificans*

zym Arginase nach folgender Reaktion katalysiert (siehe u.a. D.M. GREENBERG, 1955; S.J. BACH u. J.D. KILLIP, 1958; L. ECKERT u. Mitarb., 1966):



Unter a e r o b e n Kulturbedingungen (Abb.16) erfolgen bei der Arginase im wesentlichen die gleichen Beeinflussungen, wie sie bei der Ornithincarbamoyl-transferase und den "arginin-synthetisierenden Enzymen" festgestellt worden sind: Eine starke Förderung der Synthese durch die anorganische N-Quelle, eine geringere durch Glutamin und keine (oder nur eine sehr geringe) Förderung durch Harnstoff.

Bei den unter a n a e r o b e n Bedingungen aufgewachsenen Kulturen (Abb.17) liegen bei Harnstoff und Glutamin in etwa die gleichen Verhältnisse vor, wie sie bei der Besprechung der anderen Enzymbildungen herausgestellt worden sind. Auffallend ist aber hier die sehr große Steigerung der spezifischen Aktivität durch die anorganische N-Quelle um rund das Achtfache (vgl. 0 und 48 Std.).

Die Ergebnisse der Versuche über die Beeinflussung der Synthese der Enzyme des Ornithin-Cyclus durch die ausgewählten N-Quellen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat fördern besonders in der jungen Kultur von M. denitrificans die Bildung der Enzyme des Cyclus so-

wohl unter a e r o b e n als auch a n a e r o b e n Kulturbedingungen. Eine Ausnahme macht lediglich die Ornithin-carbamoyl-transferase, die unter a n a e r o b e n Kulturbedingungen keine signifikante Beeinflussung zeigt (Abb.13). Es fällt fernerhin auf, daß die höchste spezifische Aktivität der Enzyme, die nach 12 beziehungsweise 24 Std. Kulturdauer gefunden wurde (Ausnahme: "argininsynthetisierende Enzyme", a n a e r o b), nicht mit dem höchsten Eiweißgehalt des Acetonepulver-Extraktes (30 Std. Kulturdauer, siehe Tab.3 und 4) zusammenfällt. Dieser Befund unterstreicht, daß bevorzugt in der jungen Kultur die Enzyme des Ornithin-Cyclus synthetisiert werden. Der Schluß, daß der Ornithin-Cyclus bei der Aufnahme des Ammoniums in den N-Stoffwechsel wirksam ist, gewinnt damit eine weitere Stütze. Bemerkenswert ist noch, daß - im Gegensatz zu den anderen Enzymen - die Arginase-Aktivität unter a n a e r o b e n Kulturbedingungen wesentlich größer ist als unter a e r o b e n (Abb.16 und 17).

Anders liegen die Verhältnisse bei Harnstoff als N-Quelle. Unter Luft-Atmosphäre ermöglicht er *M. denitrificans* ein sehr gutes Wachstum (siehe Abb.4, S.21), wobei aber nur die Carbamoylphosphat-synthetase gefördert wird (Abb.8 und 9). Die anderen Enzymsynthesen unter beiden Kulturbedingungen (mit Ausnahme der Ornithincarbamoyl-transferase unter a n a e r o b e n Bedingungen) werden gehemmt oder sind unbeeinflusst. Möglicherweise wird durch Harnstoff die Bildung der Enzyme durch den Mechanismus der Endprodukthemmung gesteuert. Es sei schon hier erwähnt (siehe Abb.38, S.91), daß auch die spezifische Aktivität der Urease bei dieser N-Quelle sehr niedrig ist.

Aufschlußreich ist ein Vergleich der Aktivitäten der Carbamoylphosphat-synthetase und der Ornithincarbamoyl-transferase mit dem Eiweißgehalt der Acetonpulver-Extrakte (siehe Tab.3 und 4): Bei den *a e r o b* gezogenen Harnstoffkulturen steigen der Eiweißgehalt und die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase im Verlaufe der Kultur stark an. Die Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase wird hingegen mit steigender Kulturdauer und steigendem Eiweißgehalt des Extraktes immer stärker gehemmt. - Unter *a n a e r o b e n* Kulturbedingungen sind die Verhältnisse anders: Bei einem im Verlaufe der Versuchszeit abnehmenden Eiweißgehalt des Acetonpulver-Extraktes nimmt auch die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase ab, aber die Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase steigt an. - Die Befunde sprechen für das Vorhandensein von zwei verschiedenen Ornithincarbamoyl-transferasen, wie es schon bei anderen Organismen verschiedentlich diskutiert worden ist (H. KATING, 1962b und L. ECKERT, 1968 bei *T o r u l o p s i s u t i l i s*; R.F. RAMALEY u. R.W. BERNLOHR, 1965 und R.W. BERNLOHR, 1966 bei *B a c i l l u s l i c h e n i f o r m i s*; siehe hierzu Diskussion, S.80).

Glutamin: Der Eiweißgehalt im Acetonpulver-Extrakt der mit Glutamin unter *a e r o b e n* Bedingungen gewachsenen Kulturen steigt während der Versuchsdauer stetig an (siehe Tab.3). Die Carbamoylphosphat-synthetase und die Arginase haben in der jungen (24 Std.) und in der älteren Kultur (48 Std.) jeweils eine hohe spezifische Aktivität, während bei 30 Std. Kulturdauer ein Aktivitätsminimum vorliegt. Die Bildung der Ornithincarbamoyl-transferase und der "argininsynthetisierenden

Enzyme" ist von der 12. Std. der Kulturdauer an stark gefördert und steigt stetig mit dem zunehmenden Eiweißgehalt des Acetonpulver-Extraktes bis zum Versuchsabbruch an. - In den unter a n a e r o b e n Bedingungen aufgewachsenen Kulturen nimmt mit fortschreitender Kulturdauer der Eiweißgehalt der Acetonpulver-Extrakte ab (siehe Tab.4). Sieht man von geringen Schwankungen der Enzymaktivitäten ab, so kann gesagt werden, daß die Synthese der Enzyme des Ornithin-Cyclus unter diesen Bedingungen mit dem Anstieg des Eiweißgehaltes im Acetonpulver-Extrakt parallel läuft, beziehungsweise ihm gegenüber nur in geringem Maße absinkt.

Von besonderem Interesse ist der Befund, daß bei *H. d e n i t r i f i c a n s* sowohl Ammonium als auch Glutamin gute N-Donatoren für die Synthese von Carbamylphosphat sind (siehe Abb.8-11). Die Nutzung von Glutamin als N-Donator ist jedoch nach a e r o b e r Anzucht im Vergleich zu Ammonium im Durchschnitt um mehr als das Doppelte gesteigert. Es fällt aber auf, daß die spezifische Aktivität der Carbamoylphosphat-synthetase in Abhängigkeit von den gebotenen N-Quellen stark wechselt, je nachdem, ob Ammonium beziehungsweise Glutamin als N-Donatoren verwendet werden. Die hieraus gezogenen Schlüsse über das Vorhandensein von eventuell zwei verschiedenen Carbamoylphosphat-synthetasen sind auf Seite 34 und in der Diskussion (siehe S.78) ausführlich wiedergegeben.

2. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus nach Wachstum auf Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin

Die nachfolgenden Analysen sollten klären, welchen Einfluß die Grundaminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin auf die spezifischen Aktivitäten der Enzyme in dem Kreisprozeß haben. Bei Aufzucht unter *a e r o b e n* Bedingungen (siehe Abb.5, S.22) werden Asparaginsäure und Glutaminsäure zur Zellvermehrung gleich gut genutzt, während Alanin etwas schlechter verwertet wird. Unter *a n a e r o b e n* Bedingungen erfolgt bei diesen Aminosäuren kein Wachstum des Versuchorganismus (siehe Abb.7, S.25).

Carbamoylphosphat-synthetase: In den enzymatischen Ansätzen wurde als N-Donator für die Synthese des Carbamylphosphats wiederum Ammoniak und Glutamin in Parallelversuchen eingesetzt. *V e r s u c h e u n t e r a e r o b e n K u l t u r b e d i n g u n g e n*: Die Ergebnisse der Versuche über Beeinflussung der spezifischen Aktivität der Carbamoylphosphat-synthetase nach Wachstum auf Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin sind in den Abbildungen 18 (Ammonium als N-Donator) und 19 (L-Glutamin als N-Donator) zusammengefaßt worden.

A m m o n i u m a l s N - D o n a t o r (Abb.18): Beim Wachstum auf Alanin wird die Synthese des Enzyms in den ersten 30 Std. der Kulturdauer auf das Viereinhalbfache des zum Zeitpunkt 0 gemessenen Wertes erhöht. Bei Kultur auf Glutaminsäure verläuft die Aktivitätskurve in den ersten 24 Std. in gleicher Weise und bleibt dann nach einer geringen Schwankung (30 Std.) auf etwa der gleichen Höhe. Auf der N-Quelle Asparagin-

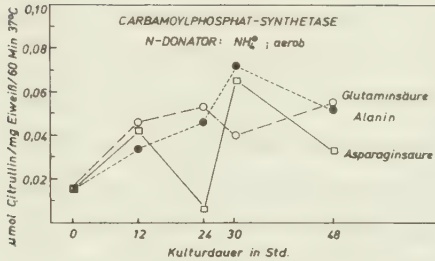


Abbildung 18: A e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin auf die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase von *Micrococcus denitrificans* mit Ammoniumsulfat als N-Donator im enzymatischen Versuchsansatz

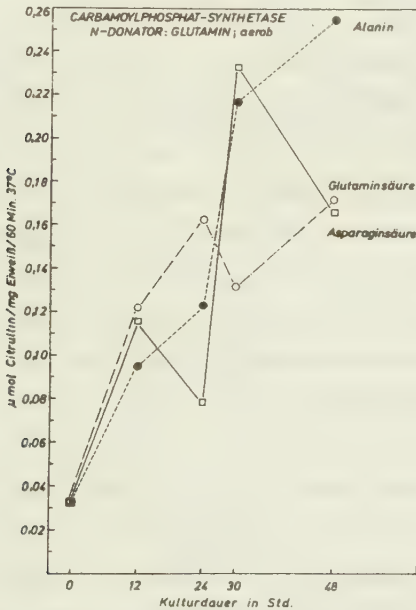


Abbildung 19: A e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin auf die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase von *Micrococcus denitrificans* mit Glutamin als N-Donator im enzymatischen Versuchsansatz

säure schwankt die spezifische Aktivität im Verlaufe der Kulturdauer stark: Ein Anstieg bis zu 12 Std. Kulturdauer, ein starkes Absinken der Aktivität nach 24 Std. unter den zum Zeitpunkt 0 gemessenen Wert, ein starker Anstieg zum Erntezeitpunkt 30 Std. und wiederum ein geringer Abfall bei Versuchsabbruch. - Ein Vergleich mit den Wachstumskurven (siehe Abb.5, S.22) zeigt, daß besonders bei Glutaminsäure und Alanin mit steigender Substanzzunahme die Enzyymbildung gefördert wird. Die höchsten spezifischen Aktivitäten liegen in der Hauptwachstumsphase. Für Asparaginsäure ist ein Zusammenhang zwischen Enzymsynthese und Zellvermehrung nicht zu erkennen.

G l u t a m i n a l s N - D o n a t o r (Abb.19): Im wesentlichen gleicht der Kurvenverlauf der spezifischen Aktivität während der Versuchsdauer den Ansätzen mit Ammonium als N-Donator. Ein deutlicher Unterschied besteht aber in der Höhe der Förderung. Bei Alanin als N-Quelle beträgt die Steigerung etwa das Siebenfache (48 Std.). Beim Wachstum auf Glutaminsäure steigt die spezifische Aktivität des Enzyms innerhalb von 48 Std. um etwa das Fünffache. Auch auf Asparaginsäure als N-Quelle ist eine Aktivitätssteigerung auf das Fünffache nach 48 Std. Kulturdauer festzustellen.

Die in den Abbildungen 18 und 19 wiedergegebenen Analysen zeigen, daß nach Wachstum von *M. denitrificans* auf Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin die Bildung von Carbamylphosphat mit Glutamin als N-Donator rund das Dreifache gegenüber den Ansätzen mit Ammonium beträgt. Die im vorhergehenden Kapitel gezogenen Schlüsse über zwei multiple Formen der

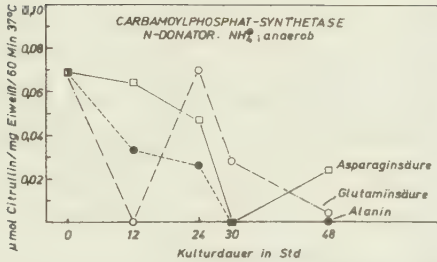


Abbildung 20: A n a e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin auf die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase von *Micrococcus denitrificans* mit Ammoniumsulfat als N-Donator im enzymatischen Versuchsansatz

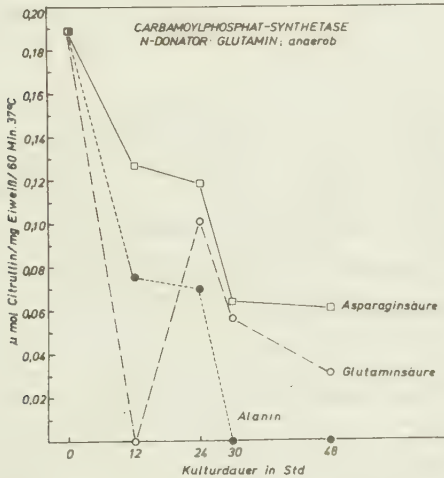


Abbildung 21: A n a e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin auf die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase von *Micrococcus denitrificans* mit Glutamin als N-Donator im enzymatischen Versuchsansatz

Carbamoylphosphat-synthetase (siehe Abb.8 und 9, S.33) werden durch diese Ergebnisse ergänzt.

Versuche unter anaeroben Kulturbedingungen: Ammonium als N-Donator (Abb.20): Bei Asparaginsäure und Alanin als N-Quellen erfolgt unter anaeroben Kulturbedingungen eine Abnahme der spezifischen Aktivität der Carbamoylphosphat-synthetase. Bei Alanin ist ab 30 Std. Kulturdauer die Synthese des Enzyms vollständig gehemmt. Auf Asparaginsäure findet in dem Zeitraum von 30 bis 48 Std. wieder ein leichter Aktivitätsanstieg statt. Glutaminsäure bewirkt in jungen Kulturen (12 Std.) eine starke Hemmung der Enzymsynthese, in den weiteren 12 Std. steigt die spezifische Aktivität wieder und sinkt dann von diesem Zeitpunkt an stetig bis zum Ende des Versuches auf eine Spur (0,004) ab.

Glutamin als N-Donator: Bei den gleichen Kulturbedingungen unterscheiden sich die spezifischen Aktivitäten der Carbamoylphosphat-synthetase, wenn Glutamin als N-Donator im enzymatischen Ansatz eingesetzt wird, im Vergleich zu Ammonium als N-Donator nur quantitativ (Abb.21): Glutamin bewirkt eine Steigerung der Aktivitäten um etwa das Doppelte.

Nach den in den Abbildungen 18 bis 21 wiedergegebenen Untersuchungsergebnissen wird also in aerob gewachsenen Kulturen mit Asparaginsäure, Glutaminsäure oder Alanin als jeweils alleinige N-Quelle die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase mit fortschreitender Kulturdauer stark gefördert. Unter anaeroben Bedingungen hingegen wird die spe-

zifische Aktivität stark gehemmt. Glutamin als N-Donator erzeugt im enzymatischen Ansatz immer eine höhere spezifische Aktivität als Ammonium. Ein Vergleich mit den Untersuchungen bei den Hefen *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis* (L. ECKERT, 1968) beim Wachstum auf diesen N-Quellen ergibt, daß die spezifischen Aktivitäten in *M. denitrificans* gegenüber *Torulopsis* generell um etwa das Fünffache höher liegen. Bei *Endomycopsis* wird nach Umpflanzung vorgezogener Pilzdecken auf neue Nährlösungen mit Asparaginsäure und Glutaminsäure als N-Quelle die Bildung des Enzyms schon nach 6 beziehungsweise 12 Std. vollständig gehemmt.

Ornithincarbamoyl-transferase: Da die Synthese der Carbamoylphosphat-synthetase nach Wachstum des Versuchsorganismus auf Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin mit zunehmendem Alter der Kultur unter *aeroben* Bedingungen stark gefördert wird, wäre zu vermuten, daß auch die spezifische Aktivität der Ornithincarbamoyl-transferase unter den gleichen Kulturbedingungen gefördert ist, um das gebildete Carbamylphosphat in den Cyclus einzuschleusen. Abb.22 zeigt, daß dies für Asparaginsäure und Glutaminsäure nicht zutrifft. Beide Aminosäuren hemmen die Enzymsynthese. Die spezifische Aktivität fällt bei Asparaginsäure von 1,63 auf 0,28 und bei Glutaminsäure auf 0,16 im Verlaufe der Kulturdauer ab (vgl. 0 Std. und 48 Std.). Anders verhält sich der Organismus beim Wachstum auf Alanin. Die Enzymsynthese nimmt im Verlaufe der Kulturdauer zu (spez. Akt. 1,0 bei 12 Std. und 1,45 nach 48 Std.).

Unter *anaeroben* Bedingungen (Abb.23) sinkt die spe-

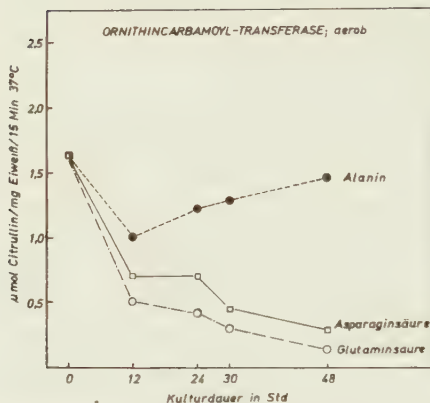


Abbildung 22: A e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin auf die Synthese der Ornithinecarbamoyl-transferase von *Micrococcus denitrificans*

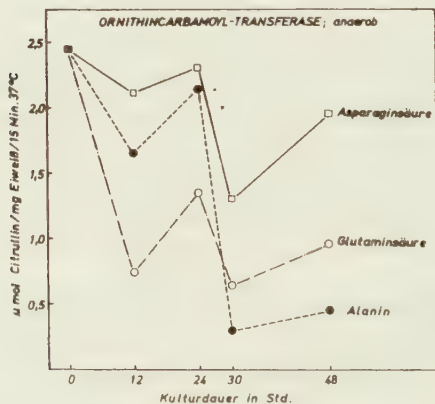


Abbildung 23: A n a e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin auf die Synthese der Ornithinecarbamoyl-transferase von *Micrococcus denitrificans*

zifische Aktivität der Ornithincarbamoyl-transferase im Verlaufe der Kultur auf den drei Aminosäuren stufenweise ab. Die Verminderung der Enzymsynthese im Verlaufe der Versuchszeit ist jedoch auf den drei N-Quellen verschieden groß. Setzt man die spezifische Aktivität zum Zeitpunkt 0 gleich 100%, so ist bei Versuchsabbruch (48 Std.) für Asparaginsäure noch ca. 80%, für Glutaminsäure ca. 40% und für Alanin nur noch ca. 20% dieser Aktivität nachzuweisen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß unter dem Einfluß der genannten Aminosäuren sowohl unter *a e r o b e n* als auch *a n a e r o b e n* Bedingungen (mit Ausnahme von Alanin in der aeroben Kultur) die Bildung der Ornithincarbamoyl-transferase im Verlaufe der Versuchszeit gehemmt wird. Es fällt auf, daß unter *a e r o b e n* Kulturbedingungen die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase während der Kulturdauer ansteigt und die Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase beim Wachstum auf den N-Quellen Asparaginsäure und Glutaminsäure absinkt und bei Alanin nur leicht ansteigt. Möglicherweise wird - besonders bei den ersten beiden Aminosäuren - ein Teil des gebildeten Carbamylphosphats für andere Synthesen (z.B. von Pyrimidinderivaten) verwandt und nicht in den Kreisprozeß eingeschleust. Ein Vergleich mit den Hefen *E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s* und *T o r u l o p s i s u t i l i s* (L. ECKERT, 1968) zeigt, daß nur Asparaginsäure bei *E n d o m y c o p s i s* leicht hemmt, während alle anderen N-Quellen mehr oder weniger fördernd auf die Bildung der Ornithincarbamoyl-transferase einwirken. Es müßte geprüft werden, ob bei der Assimilation der N-Quellen Asparaginsäure und Glutamin-

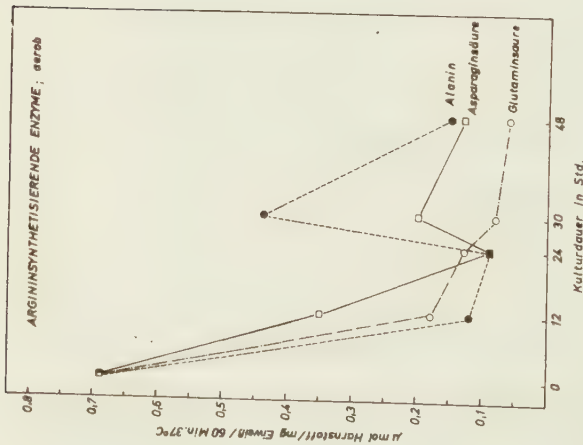


Abbildung 24: A e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin auf die Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme" von *Micrococcus denitrificans*.

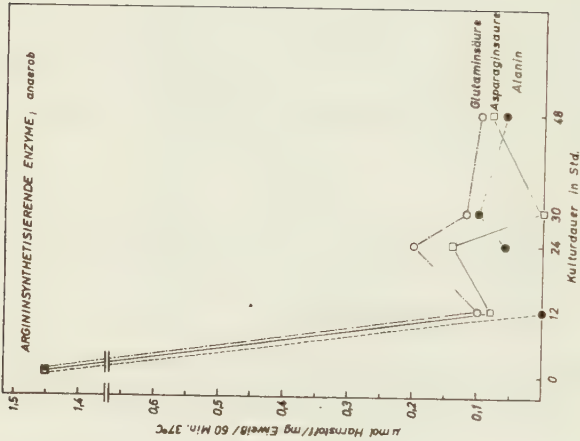


Abbildung 25: A n a e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin auf die Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme" von *Micrococcus denitrificans*.

säure bei *M. denitrificans* (im Gegensatz zu den beiden genannten Hefen) der Ornithin-Cyclus weitgehend ausgeschaltet wird und Transaminierungsreaktionen mit den beiden Grundamino-säuren im Vordergrund stehen.

"Argininsynthetisierende Enzyme": Die spezifische Aktivität des Enzymsystems ist zum Zeitpunkt der Animpfung beziehungsweise Umpflanzung (spez.Akt.ca. 0,7 beziehungsweise 1,45) sehr hoch (Abb.24 und 25). Bereits nach 12 Std. Kulturdauer hat unter *aeroben* Wachstumsbedingungen (Abb.24) die spezifische Aktivität unter dem Einfluß der verwandten N-Quellen recht unterschiedliche Werte: Bei Asparaginsäure 0,35, bei Glutaminsäure 0,18 und bei Alanin 0,12. Beim Wachstum auf Glutaminsäure sinkt die Synthese des Enzymsystems ähnlich wie bei der Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase bis zum Versuchsabbruch weiter ab (spez.Akt. 0,06 nach 48 Std.). Bei Asparaginsäure und Alanin liegt ein Aktivitätsgipfel zum Zeitpunkt 30 Std. vor (spez.Akt. 0,20 beziehungsweise 0,44). Bei Versuchsabbruch ist jedoch die spezifische Aktivität in beiden Ansätzen wieder gesunken (rund 0,15).

Auch unter *anaeroben* Kulturbedingungen (Abb.25) stellt sich in den ersten 12 Std. von dem hohen Ausgangswert zum Zeitpunkt der Umpflanzung eine niedrige spezifische Aktivität ein (etwa 0,1 beziehungsweise 0). Unter relativ geringen Schwankungen (wobei auf dem Glutaminsäure-Medium nach 30 Std. Kulturdauer wiederum keine Aktivität gemessen wurde) wird bei allen drei N-Quellen nach 48 Std. eine spezifische Aktivität zwischen 0,06 und 0,10 gefunden.

Zusammenfassend ist über die Beeinflussung der "argininsynthetisierenden Enzyme" durch die drei eingesetzten Aminosäuren zu sagen, daß - abgesehen von den hohen Werten unter *aeroben* Bedingungen auf Alanin (nach 30 Std.) und Asparaginsäure (nach 12 Std.) - die spezifischen Aktivitäten der Kulturen unter *aeroben* als auch *anaeroben* Bedingungen etwa auf gleicher Höhe liegen (zwischen 0,06 bis 0,15). Ein verstärkter Einfluß der Asparaginsäure (als Reaktionspartner bei der Synthese von Arginin) konnte nicht festgestellt werden. Der Vergleich der spezifischen Aktivitäten der "argininsynthetisierenden Enzyme" mit den bei *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis* (L. ECKERT, 1968) gefundenen Werten auf diesen N-Quellen zeigt, daß nur bei *Endomycopsis* die Enzyymbildung durch Glutaminsäure stark gefördert wird. Die beiden anderen Aminosäuren haben keinen signifikanten Einfluß.

Arginase: In den *aerob* gezogenen Kulturen wird durch Alanin die Bildung der Arginase ähnlich wie die der Carbamoylphosphat-synthetase und Ornithincarbamoyl-transferase im Verlaufe der Kulturdauer stark gefördert (Abb.26). Nach 48 Std. Kulturdauer wird der neunfache Wert gegenüber der Aktivität zum Zeitpunkt 0 gemessen. Glutaminsäure hingegen bewirkt nach einer anfänglichen stärkeren Förderung der Synthese (siehe 24 Std.) nach 48 Std. Kulturdauer nur eine Aktivitätszunahme um das Zweieinhalbfache. Auf Asparaginsäure als N-Quelle liegen zwei Aktivitätsmaxima bei 12 und 30 Std. Kulturdauer vor. Bei Versuchsabbruch ist die spezifische Aktivität etwa gleich hoch.

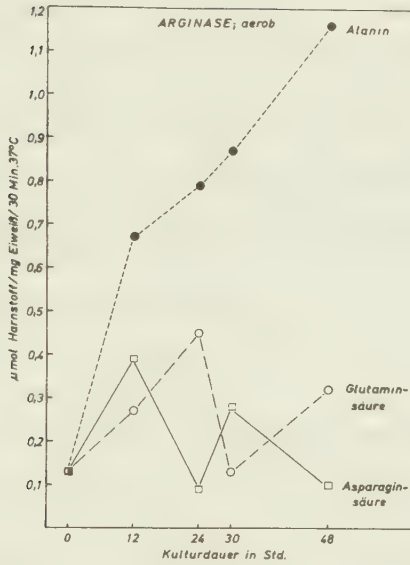


Abbildung 26: A e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin auf die Synthese der Arginase von *Micrococcus denitrificans*

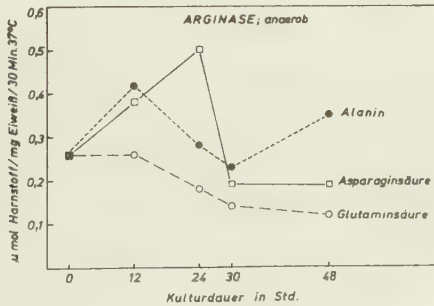


Abbildung 27: A n a e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin auf die Synthese der Arginase von *Micrococcus denitrificans*

wie zu Kulturbeginn.

Unter *a n a e r o b e n* Bedingungen (Abb.27) bewirken Asparaginsäure (12 Std.) und Alanin (24 Std.) in der jungen Kultur eine starke Förderung der Enzymsynthese. Im weiteren Verlaufe der Kultur sinkt die Enzyymbildung ab. Glutaminsäure im Nährmedium bedingt von Beginn der Umpflanzung an eine Hemmung der Arginasebildung (spez.Akt. 0,26 zu Beginn der Kultur auf 0,12 bei Versuchsabbruch). Der fördernde Einfluß von Alanin ist unter *a n a e r o b e n* Bedingungen wesentlich geringer als bei der *a e r o b e n* Parallelkultur.

Die hier vorgelegten Befunde über die Beeinflussung der Enzyme des Ornithin-Cyclus durch die Grundaminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin lassen sich insgesamt folgendermaßen zusammenfassen: Bei *M. d e n i t r i f i c a n s* fördert Asparaginsäure unter *a e r o b e n* Kulturbedingungen - besonders in älteren Kulturen - deutlich nur die Synthese der Carbamoylphosphat-synthetase. Alle anderen Enzyme werden vornehmlich mit zunehmendem Alter der Kultur gehemmt. In den unter *a n a e r o b e n* Bedingungen aufgezogenen Kulturen liegen - bedingt durch die Vorkultur - die spezifischen Aktivitäten einiger Enzyme bei Kulturbeginn sehr hoch. Sie sinken im Verlaufe der Kultur beim Wachstum auf Asparaginsäure ab. Bemerkenswert ist der Befund, daß die spezifische Aktivität der Ornithincarbamoyl-transferase nach *a n a e r o b e r* Anzucht um rund das Dreieinhalbfache höher liegt, als bei *a e r o b e r* Kultur. - Die Eiweißgehalte im Acetontrockenpulver (siehe Tab.3, S.27) der unter *a e r o b e n* Bedingungen gezoge-

nen Kulturen steigen mit der Versuchsdauer an. Mit Ausnahme der Carbamoylphosphat-synthetase sinken die spezifischen Aktivitäten der übrigen Enzyme mit steigendem Eiweißgehalt. Das zeigt, daß mit dieser gesteigerten Eiweißsynthese nicht eine gesteigerte Enzymeiweiß-Synthese für den hier untersuchten Kreisprozeß Hand in Hand geht. In den *a n a e r o b* gezogenen Kulturen bleibt der Eiweißgehalt des Acetonrockenpulvers praktisch unverändert (siehe Tab.4, S.28).

Glutaminsäure: Der Einfluß dieser Aminosäure ähnelt weitgehend sowohl unter *a e r o b e n* als auch *a n a e r o b e n* Kulturbedingungen der vorher besprochenen Einwirkung der Asparaginsäure. Ein Unterschied besteht jedoch darin, daß das Eiweiß im Acetonpulver-Extrakt (siehe Tab.3 und 4, S.27 und 28) unter beiden Kulturbedingungen in der jungen Kultur (24 Std.) ansteigt^u und dann zum Versuchsende hin wieder absinkt. Die Verminderung der spezifischen Enzymaktivität in den älteren Kulturen (mit Ausnahme der Carbamoylphosphat-synthetase unter aeroben Bedingungen) fällt hier mit einer Abnahme der Eiweißproduktion zusammen.

Alanin als N-Quelle fördert unter *a e r o b e n* Bedingungen während der Kulturdauer die Synthese aller Enzyme des Ornithin-Cyclus (Förderung der Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme" aber nur zum Zeitpunkt 30 Std.). Bemerkenswert sind die besonders hohen spezifischen Aktivitäten der Arginase. Gleich hohe Aktivitäten wurden nur bei der N-Quelle Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat unter *a n a e r o b e n* Bedingungen gefunden. Unter *a n a e r o b e n* Kulturbedingungen hemmt Alanin die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase nach

30 Std. Kulturdauer vollständig. - Die Eiweißwerte des Acetonpulver-Extraktes (siehe Tab.3, S.27) liegen bei den a e r o b aufgewachsenen Kulturen im Vergleich zu den anderen N-Quellen relativ hoch. Es fällt aber auf, daß die Eiweißsynthese zwischen den Erntezeitpunkten 12 Std. und 48 Std. nur geringfügig ansteigt. Die teilweise sehr starke Erhöhung der spezifischen Aktivitäten der Enzyme beim Wachstum von M. d e n i t r i f i c a n s auf Alanin während dieses Zeitraumes zeigt an, daß im Acetonpulver-Extrakt die Synthese der Enzymeiweiße (auf Kosten anderer Proteine) stark gefördert ist. Unter a n a e r o b e n Versuchsbedingungen verändert sich der Eiweißgehalt des Acetonpulver-Extraktes im Verlaufe der Kulturdauer praktisch nicht.

3. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus nach Wachstum auf Ornithin, Citrullin und Arginin

Von besonderem Interesse war es zu prüfen, welche Einflüsse die Aminosäuren des Ornithin-Cyclus auf die spezifischen Aktivitäten des Kreisprozesses im Verlaufe des Wachstums unter a e r o b e n und a n a e r o b e n Kulturbedingungen ausüben. Im Gegensatz zu der vorher besprochenen Gruppe, die ein fast gleiches Wachstum des Versuchsorganismus bei a e r o b e r Kultur ermöglichte, ist nach den in Abb.6 (S.23) dargestellten Ergebnissen unter a e r o b e n Wachstumsbedingungen die Verwertung der Aminosäuren des Ornithin-Cyclus sehr unterschiedlich. In Kulturen unter a n a e r o b e n Bedingungen erfolgt auf diesen N-Quellen kein Wachstum (siehe Abb.7, S.25).

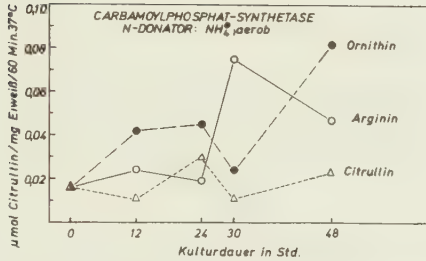


Abbildung 28: A e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Ornithin, Citrullin und Arginin auf die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase von *Micrococcus denitrificans* mit Ammoniumsulfat als N-Donator im enzymatischen Versuchsansatz

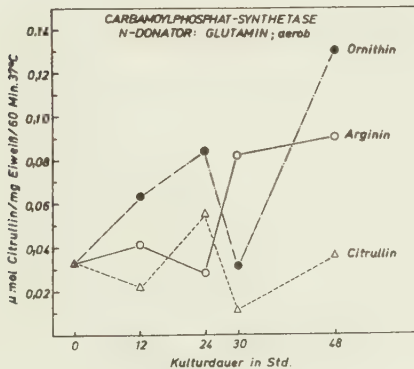


Abbildung 29: A e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Ornithin, Citrullin und Arginin auf die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase von *Micrococcus denitrificans* mit Glutamin als N-Donator im enzymatischen Versuchsansatz

Carbamoylphosphat-synthetase: Wiederum wurden in den enzymatischen Ansätzen als N-Donatoren Ammonium und Glutamin bei der Bildung des Carbamylphosphats eingesetzt.

Versuche unter aeroben Kulturbedingungen: Ammonium als N-Donator (Abb.28): Auf der N-Quelle Ornithin wird die Synthese des Enzyms in den ersten 24 Std. der Kulturdauer auf knapp das Dreifache gefördert, sinkt dann bis 30 Std. ab und steigt danach erneut bis 48 Std. auf rund das Fünffache der Ausgangsaktivität an. Hierbei ist es bemerkenswert, daß bis zu 36 Std. Kulturdauer kaum eine Zellvermehrung erfolgt (siehe Abb.6, S.23). Die Induktion der Enzymsynthese ist in diesem Falle wohl darauf zurückzuführen, daß beim Wachstum auf Ornithin auch die Ornithincarbamoyl-transferase im gleichen Rhythmus (siehe Abb. 32) gefördert wird. Es liegt offenbar eine Induktion durch Ornithin (=Substrat für die zweite Enzymreaktion) für beide Enzyme vor. Ab 36 Std. beginnt das Hauptwachstum auf dieser N-Quelle. Zu diesem Zeitpunkt setzt nochmals eine Förderung der Enzymbildung ein (vgl. Abb.6 und 29). Erst in diesem Zeitraum steigt die Eiweißmenge im Acetonpulver-Extrakt sprunghaft an (siehe Tab.3, S.27). Offenbar steht dieser zweite Aktivitätsanstieg in engem Zusammenhang mit der Wachstumsförderung. Arginin als N-Quelle hat in jungen Kulturen keinen Einfluß auf die Höhe der spezifischen Enzymaktivität. Erst ab 30 Std. Kulturdauer, kurz bevor das Hauptwachstum einsetzt, erfolgt ein Aktivitätsanstieg um rund das Fünffache (beziehungsweise Dreifache nach 48 Std. Kulturdauer). Dieser Aktivitätsanstieg ist offenbar auf die zu diesem Zeitpunkt stark einsetzende Zell-

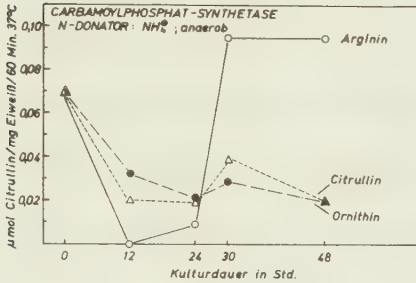


Abbildung 30: Anaerobe Kulturbedingungen: Einfluß von Ornithin, Citrullin und Arginin auf die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase von *Micrococcus denitrificans* mit Ammoniumsulfat als N-Donator im enzymatischen Versuchsansatz

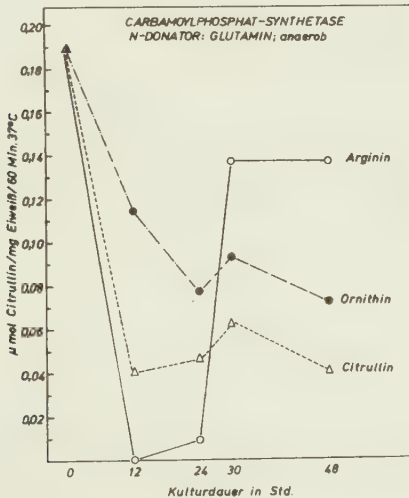


Abbildung 31: Anaerobe Kulturbedingungen: Einfluß von Ornithin, Citrullin und Arginin auf die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase von *Micrococcus denitrificans* mit Glutamin als N-Donator im enzymatischen Versuchsansatz

vermehrung zurückzuführen (vgl. Abb.6). Citrullin bewirkt (von geringen Schwankungen abgesehen) keine signifikante Änderung der spezifischen Aktivität im Verlaufe der Kultur.

G l u t a m i n a l s N - D o n a t o r: Die in Abb.29 wiedergegebenen Analysen mit Glutamin als N-Donator für die Carbamylphosphat-Synthese unterscheiden sich nur quantitativ von den vorher besprochenen Befunden. Die spezifischen Aktivitäten aller Bestimmungen liegen knapp doppelt so hoch wie mit Ammonium als N-Donator.

V e r s u c h e u n t e r a n a e r o b e n K u l t u r - b e d i n g u n g e n (N_2/CO_2 -Begasung): Ammonium als N-Donator (Abb.30): Unter anaeroben Bedingungen wird die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase anders als bei den gleichen N-Quellen unter aeroben Wachstumsbedingungen beeinflusst. Ab 12 Std. Kulturdauer bleibt die spezifische Aktivität nach Anzucht auf Ornithin und Citrullin fast gleich hoch. Nur Arginin bewirkt (nach vollständiger Hemmung bei 12 Std. Kulturdauer) eine sehr starke Steigerung der Enzymaktivität bis 48 Std. (spez.Akt. 0,095).

G l u t a m i n a l s N - D o n a t o r (Abb.31): Wiederum liegen bei Einsatz dieses N-Donators im wesentlichen nur quantitative Unterschiede gegenüber den Ansätzen mit Ammonium vor. Allerdings sind hier die spezifischen Aktivitäten mit Ornithin als N-Quelle gegenüber Citrullin deutlich erhöht (vgl. Abb.30 und 31).

Aus den in den Abbildungen 28 - 31 dargestellten Ergebnissen geht hervor, daß in Kulturen unter aeroben Bedingungen

die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase am stärksten gefördert ist, wenn Ornithin als Akzeptor des gebildeten Carbamoylphosphats im Nährmedium vorhanden ist. Wird auf Citrullin als N-Quelle angezogen, so bleibt die Enzyymbildung im Durchschnitt etwa auf gleicher Höhe des zum Zeitpunkt 0 beziehungsweise 12 Std. (anaerobe Kulturbedingungen) gemessenen Wertes. Arginin fördert die Enzymsynthese - wahrscheinlich im Zusammenhang mit der spät einsetzenden Hauptwachstumsphase - nur in älteren Kulturen. Unter anaeroben Kulturbedingungen wird nur durch Arginin in der älteren Kultur die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase gefördert, während durch Ornithin und Citrullin die Enzymsynthese im Verlaufe der Kulturdauer nicht beeinflußt oder sogar gehemmt wird. In diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen von L. ECKERT (1968) von Interesse, der fand, daß bei *Torulopsis utilis* ebenfalls Arginin die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase fördert, während sie durch Ornithin unbeeinflußt bleibt und Citrullin bereits nach 6 Std. vollständig hemmt. Bei *Endomycopsis vernalis* hat unter den gleichen Versuchsbedingungen Arginin keinen Einfluß auf die Enzyymbildung, Ornithin und Citrullin hemmen sie schon nach 6 Std. Kulturdauer vollständig.

Ornithincarbamoyl-transferase (Abb.32 und 33): Unter aeroben Bedingungen fördert das Substrat für die Enzymwirkung, Ornithin, die Enzymsynthese am stärksten (rund das Dreifache gegenüber dem Beginn der Kultur; beachte aber das Minimum nach 30 Std. Kulturdauer). Wird Arginin als N-Quelle geboten so tritt zunächst eine Hemmung (bis 24 Std.) und dann ein An-

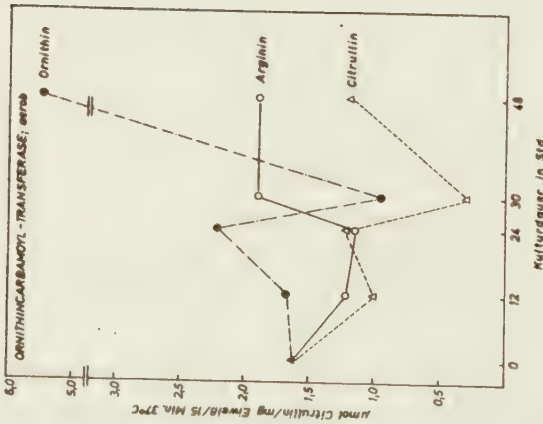


Abbildung 22: A e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Ornithin, Citrullin und Arginin auf die Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase von *Micrococcus denitrificans*.

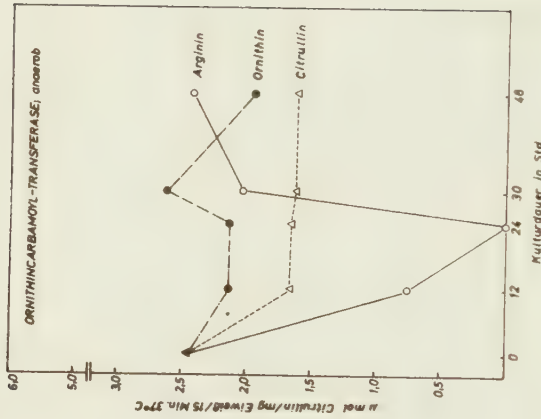


Abbildung 22: A n a e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Ornithin, Citrullin und Arginin auf die Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase von *Micrococcus denitrificans*.

stieg der spezifischen Enzymaktivität bis zum Abbruch des Versuches auf knapp das Doppelte des zum Zeitpunkt 24 Std. gemessenen Wertes ein. Beim Wachstum auf Citrullin nimmt die Enzymsynthese bis zu 30 Std. Kulturdauer stark ab und steigt erst in der älteren Kultur (48 Std.) erneut an, bleibt aber unter dem Wert der Ausgangsaktivität.

Unter *a n a e r o b e n* Bedingungen (Abb.33) hat die Anzucht auf Citrullin und Ornithin keinen wesentlichen Einfluß auf die Höhe der Enzymaktivität. Bei der erstgenannten N-Quelle nimmt die spezifische Aktivität der Ornithincarbamoyl-transferase von 2,45 (zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns) auf ca. 1,6 (12 Std.) ab. Im weiteren Verlaufe der Kultur bleibt dieser Wert praktisch unverändert. In dem Ornithin-Nährmedium ist die Enzymsynthese, abgesehen von dem Wert zum Zeitpunkt 30 Std., schwach gehemmt. Von besonderem Interesse ist der Einfluß von Arginin auf die Bildung der Ornithincarbamoyl-transferase. In der jungen Kultur (Ausgangsaktivität 2,45) sinkt die Enzymsynthese rasch ab und ist nach 24 Std. vollständig gehemmt. Danach folgt ein steiler Anstieg und nach 48 Std. ist die zu Beginn der Kultur gemessene spezifische Aktivität wieder erreicht.

Diese unter *a e r o b e n* als auch *a n a e r o b e n* Kulturbedingungen gewonnenen Ergebnisse lassen einen Zusammenhang zu der vorher besprochenen Beeinflussung der Carbamoylphosphat-synthetase (Abb.28 - 31) erkennen. Ornithin als Akzeptor des Carbamylphosphats fördert die Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase unter *a e r o b e n* Bedingungen

am stärksten und hemmt unter *a n a e r o b e n* Bedingungen die Enzymsynthese am geringsten. Citrullin im Nährmedium beeinflusst unter *a e r o b e n* als auch *a n a e r o b e n* Bedingungen die Enzymsynthese im Verlaufe der Kulturdauer im Sinne einer schwachen Hemmung (= "Endprodukt-Hemmung"). Auf dem Arginin-Medium wird unter beiden Kulturbedingungen die Bildung der Ornithincarbamoyl-transferase in der jungen Kultur stark gehemmt und ab 24 Std. Kulturdauer stark gefördert. Bei den Hefen *E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s* und *T o r u l o p s i s u t i l i s* (L. ECKERT, 1968) ergeben sich hinsichtlich der Beeinflussung der Bildung der Ornithincarbamoyl-transferase beim Wachstum auf diesen N-Quellen mit den Befunden bei *M. d e n i t r i f i c a n s* nur teilweise Übereinstimmungen. Ornithin hat bei *E n d o m y c o p s i s* keinen Einfluß und fördert lediglich bei *T o r u l o p s i s* schwach die Enzymbildung. Citrullin bewirkt bei beiden Hefen eine sehr starke Steigerung der spezifischen Aktivität des Enzyms, während Arginin die Enzymsynthese bei *E n d o m y c o p s i s* stark fördert und bei *T o r u l o p s i s* unbeeinflusst läßt.

"Argininsynthetisierende Enzyme": Sowohl im Ansatz unter *a e r o b e n* (Abb.34) als auch *a n a e r o b e n* (Abb.35) Wachstumsbedingungen ist die spezifische Aktivität des Enzymsystems zu Beginn der Kultur mit 0,69 beziehungsweise 1,45 recht hoch. In den jungen Kulturen sinkt die Enzymaktivität sehr rasch. In den *a e r o b e n* Kulturversuchen nimmt sie bei Citrullin als N-Quelle nach 12 Std. auf 0,06, auf Arginin innerhalb der ersten 24 Std. auf 0,16 und auf Ornithin in 30 Std. ebenfalls

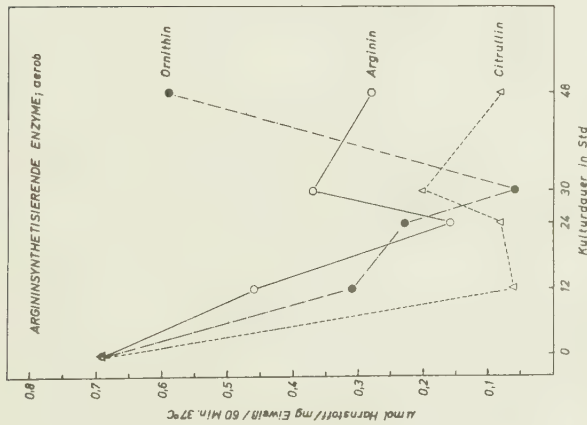


Abbildung 34: A e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Ornithin, Citrullin und Arginin auf die Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme" von *Micrococcus denitrificans*.

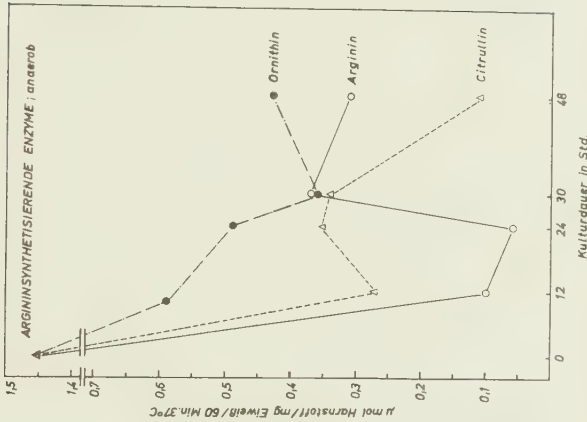


Abbildung 35: A n a e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Ornithin, Citrullin und Arginin auf die Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme" von *Micrococcus denitrificans*.

auf 0,06 ab. Von diesen Aktivitätsminima aus steigt bei Kultur auf Ornithin die spezifische Aktivität bis zum Abbruch des Versuches stark auf 0,59 an. Auf Citrullin und Arginin ist bei 30 Std. jeweils ein neues Maximum vorhanden, jedoch liegen bei Versuchsabbruch mit 0,07 beziehungsweise 0,28 wesentlich geringere spezifische Aktivitäten als beim Wachstum auf Ornithin vor.

Unter *a n a e r o b e n* Kulturbedingungen (Abb.35) zeigen die Kurven der spezifischen Aktivitäten einen fast gleichen Verlauf wie in Abb.34, jedoch sind die Minima der Enzymaktivität in der Zeit etwas verschoben und die Werte bei Versuchsabbruch anders: Ornithin = 0,43; Arginin = 0,31 und Citrullin = 0,11. Wiederum fällt auf, daß Citrullin, das Substrat für die Enzymwirkung, gegenüber den anderen Aminosäuren des Ornithin-Cyclus die geringste spezifische Aktivität bewirkt.

Es ist aus dieser Versuchsreihe als bemerkenswert festzuhalten, daß bei Kultur auf Ornithin unter *a e r o b e n* als auch *a n a e r o b e n* Bedingungen die Enzymsynthese bis 30 Std. Kulturdauer gering ist, dann aber bis zum Versuchsabbruch die Bildung des Enzymsystems deutlich gefördert wird. Auf Arginin im Kulturmedium ist unter den beiden Kulturbedingungen die spezifische Aktivität ebenfalls erst in der älteren Kultur erhöht. Der Grund hierfür ist offenbar in dem Verlauf der Wachstumskurven bei diesen beiden Aminosäuren (Abb.6, S.23) als N-Quellen zu suchen: Erst nach 24 beziehungsweise 36 Std. Kulturdauer setzt bei diesen N-Quellen eine stärkere Zellvermehrung ein. In beiden Kulturreihen hemmt das Substrat Citrullin

die Enzymsynthese im Vergleich zu den beiden anderen Reihen. Wiederum wirken diese N-Quellen bei *M. denitrificans* anders als bei *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis* (siehe L. ECKERT, 1968) auf die Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme" ein. Auf Arginin als N-Quelle hatten beide Hefen die höchste spezifische Aktivität des Enzymsystems. Wurden die Versuchsorganismen auf Citrullin kultiviert, so war die Enzymsynthese deutlich, aber schwächer als auf Arginin gefördert. Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei *M. denitrificans* steht der Befund, daß Ornithin bei *Torulopsis* die Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme" nur schwach fördert und bei *Endomycopsis* deutlich hemmt.

Arginase: Beim Wachstum des Versuchsorganismus im Nährmedium mit Ornithin, Arginin und Citrullin unter *aeroben* Kulturbedingungen (Abb.36) wird in allen Fällen die Synthese der Arginase gefördert. Auf Ornithin erreicht die spezifische Enzymaktivität nach 48 Std. Kulturdauer den etwa sechsfachen Wert gegenüber der zu Beginn der Versuchsreihe gemessenen Aktivität. Bei Arginin und Citrullin beträgt die Steigerung etwa das Viereinhalbfache. Es ist jedoch zu beachten, daß die spezifische Aktivität beim Wachstum auf Arginin zum Erntezeitpunkt 30 Std. ebenfalls eine Steigerung auf rund das Sechsfache erreicht.

Unter *anaeroben* Kulturbedingungen (Abb.37) ist die Synthese des Enzyms nur nach Anzucht auf Arginin und auf Ornithin schwach gefördert (von 0,26 auf 0,35 nach 48 Std.). Allerdings ist bei Anzucht auf Ornithin in der jungen Kultur

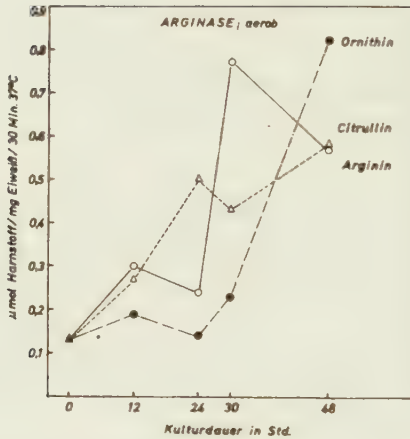


Abbildung 36: A e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Ornithin, Citrullin und Arginin auf die Synthese der Arginase von *Micrococcus denitrificans*

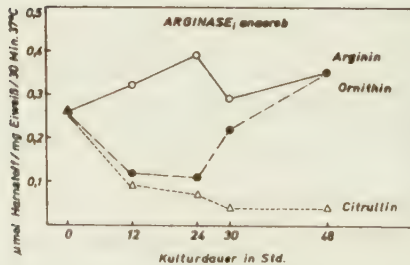


Abbildung 37: A n a e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Ornithin, Citrullin und Arginin auf die Synthese der Arginase von *Micrococcus denitrificans*

(siehe 12 und 24 Std.) die Enzymaktivität deutlich vermindert. In dem Citrullin-Nährmedium nimmt die spezifische Aktivität der Arginase mit fortschreitender Kulturdauer stetig ab. Unter diesen Kulturbedingungen liegt also der einzige Fall vor, in dem eine Aminosäure des Ornithin-Cyclus die Synthese der Arginase hemmt. Bei den Hefen *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis* (L. ECKERT, 1968) ist die spezifische Aktivität der Arginase auf allen drei Aminosäuren des Ornithin-Cyclus gefördert. Bemerkenswert ist, daß die spezifischen Aktivitäten bei den Hefen etwa um eine Zehnerpotenz höher als bei *M. denitrificans* liegen.

Der Einfluß der Aminosäuren des Ornithin-Cyclus auf die Synthese der Enzyme des Ornithin-Cyclus kann abschließend folgendermaßen zusammengefaßt werden: Ornithin fördert unter *aeroben* Wachstumsbedingungen besonders in der älteren Kultur die Synthese aller Enzyme des Cyclus. Das ist deshalb bemerkenswert, weil bei den Hefen *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis* gerade diese Aminosäure generell die Enzymbildungen hemmt (L. ECKERT, 1968). Bei *anaerob*er Anzucht hingegen wird nur die Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme" und der Arginase in der älteren Kultur gefördert.

Beim Wachstum auf Citrullin ist unter Luft-Atmosphäre das Wachstum nur gering (siehe Abb.6, S.23). Citrullin fördert unter diesen Bedingungen die Bildung der Arginase. Alle anderen Enzymsynthesen sind entweder unbeeinflusst oder deutlich gehemmt.

Unter *a n a e r o b e n* Bedingungen wird auffallenderweise die Arginase stark gehemmt (siehe Abb.37). Ein besonders fördernder Einfluß des Citrullins als Vorstufe für die Arginin-Synthese, wie er für mehrere Organismen beschrieben wird (siehe Diskussion, S.82), konnte nicht festgestellt werden.

Arginin im Nährmedium fördert sowohl unter *a e r o b e n* als auch *a n a e r o b e n* Kulturbedingungen ab 24 Std. Kulturdauer (Ausnahme: Arginase unter anaeroben Bedingungen) die Synthese aller Enzyme des Ornithin-Cyclus. Bemerkenswert ist noch, daß die spezifische Aktivität der "argininsynthetisierenden Enzyme" recht hoch liegt (vgl. hierzu auch L. ECKERT, 1968). Obwohl Arginin im Nährmedium in größerer Konzentration vorliegt, wird diese Verbindung also noch zusätzlich synthetisiert. - Der Eiweißgehalt der Acetonpulver-Extrakte steigt bei *a e r o b e r* Kultur auf Arginin nur in den ersten 24 Std. der Kulturdauer an (siehe Tab.3, S.27). Die spezifischen Aktivitäten der einzelnen Enzyme nehmen aber erst nach 30 Std. zu. Offensichtlich ist in den älteren Kulturen bei gleichbleibendem Gesamt-Eiweißgehalt des Acetonpulver-Extraktes die Synthese des Eiweißes für die Enzyme des Ornithin-Cyclus gefördert.

4. Diskussion der Ergebnisse über die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus

Carbamoylphosphat-synthetase: *M. d e n i t r i f i c a n s* synthetisiert Carbamylphosphat sowohl mit Ammonium als auch Glutamin als N-Donator. S.M. KALMAN u. Mitarb. (1965; Untersuchungen an *E s c h e r i c h i a c o l i*) nehmen an, daß beide Synthesewege durch das gleiche Enzym katalysiert werden, während A. PIERARD u. Mitarb. (1965; Untersuchungen an Mutan-

ten von *Escherichia coli*) das Enzym, das die Synthese von Carbamylphosphat mit Glutamin als N-Donator durchführt, unterscheiden und Glutaminocarbamoylphosphat-synthetase benennen. Bei Kultur von *M. denitrificans* auf verschiedenen N-Quellen (siehe vor allem Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Glutamin, Harnstoff; Abb.8 und 9) wird einmal die Synthese von Carbamylphosphat mit Ammonium und einmal mit Glutamin als N-Donator gefördert. Die wechselnden Enzymaktivitäten bei Einsatz der beiden N-Donatoren im enzymatischen Reaktionsgemisch zeigen an, daß wahrscheinlich zwei multiple Formen (=Isozyme) der Carbamoylphosphat-synthetase im Sinne von T. WIELAND u. G. PFLEIDERER (1962) vorliegen. - Nach den Untersuchungsergebnissen mit Ammonium als N-Donator ist das Vorliegen der mit dem Cofaktor N-Acetylglutaminsäure wirksamen Carbamoylphosphat-synthetase nicht auszuschließen (siehe hierzu G.W. BROWN u. P.P. COHEN, 1959 und L.M. HALL u. Mitarb., 1958). Untersuchungen hierzu sind mit *M. denitrificans* nicht durchgeführt worden. - Von Interesse ist fernerhin, daß unter *aeroben* Kulturbedingungen bei dem Versuchsorganismus die Synthese des Enzyms durch Harnstoff, Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Ornithin und Arginin stark gefördert wird. Bei der Hefe *Endomycopsis vernalis* hingegen fördert nur Harnstoff und bei *Torulopsis utilis* nur Arginin diese Enzymsynthese deutlich (siehe L. ECKERT, 1968). Bei *anaeroben* Kultur von *M. denitrificans* wird die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase auffallenderweise nur durch Arginin gefördert.

Ornithincarbamoyl-transferase: Der starke Anstieg der spezifischen Aktivität dieses Enzyms auf der N-Quelle Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat in der jungen Kultur (sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen) und die Aktivitätszunahme in der älteren Kultur bei Wachstum auf Arginin sprechen für das Vorhandensein von zwei Ornithincarbamoyl-transferasen, wie sie von R.F. RAMALEY u. R.W. BERNLOHR (1965) und R.W. BERNLOHR (1966) bei *Bacillus licheniformis* angenommen werden. Bei *B. licheniformis* wird nämlich die Synthese des einen Enzyms ebenfalls zunächst durch Ammonium und Glucose induziert und durch Arginin reprimiert. Im weiteren Verlaufe der Kultur wird dann ein zweites Enzym durch Arginin induziert. Es fällt fernerhin auf, daß bei Anzucht von *M. denitrificans* auf Glutaminsäure und Asparaginsäure unter aeroben Bedingungen die Synthese der Carbamoylphosphat-synthetase im Verlaufe der Kultur stark ansteigt, während die Bildung der Ornithincarbamoyl-transferase gehemmt wird. Möglicherweise wird bei diesen N-Quellen ein Teil des gebildeten Carbamylphosphats zur Synthese von Pyrimidinderivaten (L. LACROUTE u. Mitarb., 1965 und A. PIERARD u. Mitarb., 1965) oder zur Bildung von ATP (M.E. JONES, 1963) abgezweigt, so daß eine Substratinduktion für die Bildung der Ornithincarbamoyl-transferase ausbleibt. Anders liegen die Verhältnisse jedoch nach Anzucht des Organismus auf Ornithin unter gleichen Kulturbedingungen. Obwohl während der ersten 36 Std. der Kultur kaum eine Zellvermehrung erfolgt, werden die Carbamoylphosphat-synthetase und die Ornithincarbamoyl-transferase gleichsinnig gefördert. Möglicherweise wird durch Förderung der Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase durch das Substrat Or-

nithin auch die Bildung der Carbamoylphosphat-synthetase induziert und somit das zweite Substrat für die Citrullinproduktion zur Verfügung gestellt. Nach 36 Std. Kulturdauer setzt das Hauptwachstum auf Ornithin ein. Dies führt nochmals zu einer starken Bildung beider Enzyme. Dieser zweite Anstieg wird von einem sprunghaften Anstieg der Eiweißmenge im Acetonpulver-Extrakt begleitet. B. DIXON u. A.H. ROSE (1964) konnten bei *Saccharomyces cerevisiae* ebenfalls mit Ornithin die Synthese der Ornithincarbamoyl-transferase fördern. Zu entgegengesetzten Ergebnissen gelangte L. ECKERT (1968) bei *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis*. Ornithin hat keinen Einfluß oder hemmte sogar stark die Synthese beider Enzyme bei *Endomycopsis*. Nur bei *Torulopsis* war lediglich die Bildung der Ornithincarbamoyl-transferase leicht gefördert [siehe auch R.F. RAHALEY u. R.W. BERNLOHR (1965), Untersuchungen an *B. licheniformis*.]

"Argininsynthetisierende Enzyme": Das Endprodukt Arginin induziert bei den Hefen *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis* (L. ECKERT, 1968) die Synthese dieses Enzymsystems (siehe auch R.T. SCHIMKE, 1962, 1964; bei tierischen Gewebekulturen), jedoch ist diese Förderung konzentrationsabhängig. L. GORINI u. Mitarb. (1961), L. GORINI (1963) und S. UDAKA (1966) hingegen haben bei verschiedenen Mikroorganismen eine Repression der Enzymbildung durch Arginin gefunden. Für *M. denitrificans* ist es bemerkenswert, daß neben Arginin auch Ornithin (Ornithin fördert bei *Endomycopsis* und *Torulopsis* nicht) sowohl unter *aerob*

b e n als auch a n a e r o b e n Kulturbedingungen die Synthese dieses Enzymsystems - vornehmlich in den älteren Kulturen - stark gefördert wird. Auch Citrullin als N-Quelle hat bei *M. d e n i t r i f i c a n s* eine andere Wirkung auf die Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme" als wie sie bei den beiden vorgenannten Hefen von L. ECKERT (1968) und auch von R.T. SCHIMKE (1964) bei tierischen Gewebekulturen festgestellt wurde: Citrullin, das Substrat für die Enzymwirkungen, hat bei *M. d e n i t r i f i c a n s* sowohl unter a e r o b e n als auch a n a e r o b e n Kulturbedingungen keinen fördernden Einfluß auf die Bildung der "argininsynthetisierenden Enzyme". Es müßte in diesem Falle noch geprüft werden, ob auch hier eine Konzentrationsabhängigkeit für die Enzyminduktion vorliegt.

Arginase: Ihre Bildung wird durch die anorganische N-Quelle, Alanin und die Aminosäuren des Ornithin-Cyclus bei a e r o b e r Kultur am stärksten gefördert. Diese Befunde stimmen weitgehend mit den Ergebnissen von A.M. SRB u. N.N. HOROWITZ (1944), R.F. RAMALEY u. R.W. BERNLOHR (1965), M. CASTANEDA u. Mitarb. (1967) und L. ECKERT (1968) an anderen Mikroorganismen überein (siehe auch J. PAUL u. Mitarb., 1964, bei tierischen Gewebekulturen). Auffallend ist die hohe spezifische Aktivität der Arginase von *M. d e n i t r i f i c a n s* unter a n a e r o b e n Bedingungen bei Kultur auf der anorganischen N-Quelle und auf Arginin, besonders deshalb, weil unter diesen Kulturbedingungen keine Urease wirksam ist. Ornithin hemmt unter a n a e r o b e n Kulturbedingungen nur bei der jungen Kultur, fördert aber in der älteren Kultur ebenfalls

die Arginasebildung. Dies ist bemerkenswert, weil nach K.T. KOSSMANN u. Mitarb. (1964; Arginase aus Schweinelunge) und L. ECKERT u. Mitarb. (1966; Arginase bei *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis*) Ornithin ein Inhibitor der Arginase ist. Dies kann damit zusammenhängen, daß Ornithin bei *M. denitrificans* auch die Synthese der anderen Enzyme des Ornithin-Cyclus fördert oder nur schwach hemmt (siehe Abb.30, 31, 33 und 35). Mit dieser Metabolisierung wird die Ornithin-Konzentration verringert und die Hemmwirkung tritt möglicherweise dadurch nicht auf.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß die Bildung der Arginase bei diesem Organismus unter *aeroben* Bedingungen in engem Zusammenhang mit der Ureasesynthese gesehen werden muß. Im Kurvenverlauf besteht zwischen den spezifischen Aktivitäten der Arginase und Urease, wenn die Grundaminosäuren und die Aminosäuren des Ornithin-Cyclus als N-Quellen dienen, weitgehende Übereinstimmung (vgl. Abb.26, 36 und 39, 40). Unter *anaeroben* Bedingungen ist ein Vergleich nicht möglich, da hier keine Ureaseaktivität (außer bei Kultur auf Harnstoff) nachgewiesen werden konnte (siehe nächstes Kapitel).

Es muß offen bleiben, welche Faktoren die unterschiedliche spezifische Aktivität der Enzyme des Ornithin-Cyclus bei den unter *aeroben* und *anaeroben* Bedingungen kultivierten Zellen von *M. denitrificans* bewirken. Es liegt nahe, den Sauerstoffmangel für die teilweise Hemmung der Enzymsynthesen in Betracht zu ziehen. Dieser Deutung steht entgegen, daß z.B. bei Kultur unter *anaeroben* Bedin-

gungen die spezifischen Aktivitäten der Arginase auf der anorganischen N-Quelle, der Ornithincarbamoyl-transferase auf Harnstoff, der Carbamoylphosphat-synthetase auf Arginin und der "argininsynthetisierenden Enzyme" auf Arginin und Citrullin höher oder gleich hoch wie bei den a e r o b gewachsenen Kulturen sind. Es muß weiteren Untersuchungen vorbehalten sein zu prüfen, welche Faktoren bei M. d e n i t r i f i c a n s unter a n a e r o b e n Kulturbedingungen, wenn Nitrat als Energiequelle fehlt und keine Zellvermehrung stattfindet, für die Förderung der genannten Enzymsynthesen wirksam sind.

III. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE UREASEBILDUNG IN MICRO- COCCUS DENITRIFICANS

Durch den bei *M. denitrificans* vollständig ablaufenden Ornithin-Cyclus wird Harnstoff freigesetzt. Es sollte deshalb geprüft werden, auf welchem Wege das Bakterium diese Verbindung weiterverarbeitet, zumal der Versuchsorganismus unter *aeroben* Bedingungen mit Harnstoff als alleiniger N-Quelle gut wächst (siehe Abb.4, S.21). Zu diesem Fragenkomplex sei auf die Arbeiten von M. STEINER u. H. KATING (1957 und 1961) hingewiesen, die berichten, daß von drei Hefen (*Endomycopsis vernalis*, *Torulopsis utilis* und *Willisia anomala*), die ebenfalls Harnstoff gut als N-Quelle nutzen, nur *Endomycopsis vernalis* eine durch Urease katalysierte Spaltung der Verbindung in 2NH_3 und 1CO_2 durchführt. Für *Torulopsis utilis* hat H. KATING (1962b) dann eine Harnstoffnutzung durch Aufspaltung in ein Carbamyl- und ein NH_2 -Radikal nachgewiesen, wobei in einer gekoppelten Reaktion ersteres mit Ornithin zu Citrullin reagiert und das NH_2 -Radikal auf α -Ketoglutar säure zur Bildung von Glutaminsäure transferiert wird.

Es sollte deshalb zunächst geklärt werden, ob *M. denitrificans* eine Urease besitzt.

1. Versuche zum Nachweis einer Urease-Aktivität in Kulturen mit Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat als N-Quelle

Versuchsansatz: *M. denitrificans* wurde auf Schrägagarröhrchen 24 Std. lang vorgezogen und in einer Nährlösung mit Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat (später auch auf anderen N-Quellen) unter Magnetrührung bei 28°C kultiviert. Die Kulturen

unter *a n a e r o b e n* Bedingungen wurden kontinuierlich mit 85% N₂ und 15% CO₂ begast. Die Analysen wurden nach 12, 24, 30 und 48 Std. Kulturdauer durchgeführt.

Zum Urease-nachweis in *M. d e n i t r i f i c a n s* wurden die gleichen Methoden angewandt, die K. KLECZKOWSKI u. Mitarb. (1966a) bei *E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s* und *T o r u l o p s i s u t i l i s* ausgearbeitet hatten. Die Harnstoffspaltung wurde mit den nachfolgend unter *a - e* aufgeführten Präparaten geprüft, die von Kulturen gewonnen wurden, die auf anorganischer N-Quelle unter *a e r o b e n* und *a n a e r o b e n* Bedingungen gewachsen waren:

- a) Suspension von frischen *M i c r o c o c c u s*-Zellen.
- b) Phosphatpuffer-Extrakte (pH-Wert 6,7) aus dem Acetontrockenpulver des Versuchsorganismus mit und ohne Zusatz von L-Cystein als SH-Gruppen-Protektor.
- c) Tris-SO₄-Puffer-Extrakte (pH-Wert 8,0) aus dem Acetontrockenpulver mit und ohne Zusatz von L-Cystein.
- d) Drei verschiedene Eiweißfraktionen nach Entsalzung und Auftrennung des Acetontrockenpulvers an einer Sephadex-G 25 (fein)-Säule.
- e) Acetontrockenpulver-Extrakte mit Zusatz eines Ureasepräparates aus *C a n a v a l i a e n s i f o r m i s* mit 7000 Sumner-Einheiten/mg (Fa. Serva) zum Nachweis von eventuell im Acetontrockenpulver-Extrakt enthaltenen Urease-Hemmstoffen.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen sind zusammengefaßt folgende: Weder mit der Zellsuspension noch den verschiedenen Acetontrockenpulver-Extrakten (mit und ohne Zusatz des Ureaseprotektors L-Cystein) konnte eine meßbare Ammoniakfreisetzung aus dem Harnstoffsubstrat nachgewiesen werden. In den Ansätzen mit Präparaten aus älteren Kulturen stieg zwar der Ammoniakgehalt an, jedoch zeigten die Kontrollansätze ohne Harnstoffsubstrat, daß es sich hierbei um präformiertes Ammoniak

handelt.

Der Einwand, daß eine blockierte Urease vorliegen könnte, kann nach der Reinigung der Acetonpulver-Extrakte und Auftrennung in drei verschiedene Eiweißfraktionen an der Sephadex-Säule ausgeschlossen werden. In gleicher Weise sprechen auch die Versuchsansätze mit dem Zusatz eines käuflichen Ureasepräparates gegen eine Blockierung einer eventuell vorhandenen Urease durch Hemmstoffe: Die Aktivität dieses Ureasepräparates wurde nämlich nicht durch Extrakte aus dem Acetonpulver von *M. denitrificans* beeinflusst. Ureasehemmstoffe sind demnach in den verschiedenen Präparaten des Versuchsorganismus mit großer Wahrscheinlichkeit nicht vorhanden.

Es kann aus diesen Versuchen geschlossen werden, daß *M. denitrificans* unter diesen Kulturbedingungen (Aufzucht unter aeroben und anaeroben Bedingungen auf Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat als N-Quelle) keine Urease besitzt (siehe Abb. 38 und 41).

Im weiteren Verlaufe der Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß auch *Micrococcus*-Zellen, die 24 Std. auf Schrägagar oder als Vorzucht zur Umpflanzkultur (siehe S. 10) angezogen worden waren, keine nachweisbare Urease-Aktivität besitzen.

2. Adaptive Ureasebildung beim Wachstum auf Harnstoff als alleiniger N-Quelle unter aeroben Kulturbedingungen

Versuchsansatz: Das Bakterium wurde zunächst 24 Std. lang auf Schrägagarröhrchen vorgezogen, auf Harnstoffmedium umgeimpft und nach 24 und 48 Std. geerntet. Für eine weitere Versuchsreihe wurde das so kultivierte Bakterienmaterial in einem vorher sterilisierten Zentrifugenglas, das mit steriler Staniolfolie abgedeckt war, gesammelt, danach gewaschen und zur Wei-

terzucht auf eine neue Nährlösung mit Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat als N-Quelle "umgepflanzt".

In Abb.4 (siehe S.21) ist gezeigt worden, daß *M. denitrificans* auf Harnstoff als alleiniger N-Quelle gut wächst. Das Wachstum auf Harnstoff ist aber nur möglich, wenn entweder durch Ureasewirkung aus dem Harnstoff Ammoniak für die N-Assimilation freigesetzt wird oder eine Harnstoffnutzung ohne Ureasewirksamkeit erfolgt, wie sie von H. KATING (1962b) bei *Torulopsis utilis* und von A.R. COOK u. D. BOULTER (1964) bei *Candida flarerii* beschrieben worden ist.

Tabelle 5: A e r o b' e Kulturbedingungen: Spezifische Urease-Aktivität in Acetonpulver-Extrakten (Tris-SO₄-Puffer-Extrakt) von *M i c r o c o c c u s d e n i t r i f i c a n s* nach Wachstum auf Harnstoff als N-Quelle

Acetonpulver-Extrakt aus Kulturen im Alter von Std.	Wachstum auf N-Quelle	Spez. Aktivität in μ mol Harnstoff/mg Eiweiß/30 Min./37°C
24	Harnstoff	0,60
24	Harnstoff	0,53
48	Harnstoff	0,38
48	Harnstoff	0,23

In Tab.5 sind die Ergebnisse einer repräsentativen Versuchsreihe zum Nachweis von Urease in *M i c r o c o c c u s*-Zellen, die auf Harnstoff als alleiniger N-Quelle unter a e r o b e n Kulturbedingungen gewachsen waren, wiedergegeben worden. Junge Kulturen von *M. d e n i t r i f i c a n s* (24 Std. alt) haben eine höhere spezifische Urease-Aktivität als ältere Kulturen (48 Std.): Etwa 0,57 gegenüber etwa 0,30. Diese spezifischen Aktivitäten liegen um rund eine Zehnerpotenz niedriger als diejenigen, die bei der ureasereichen *E n d o m y c o p s i s*

v e r n a l i s gefunden wurden (vgl. K. KLECZKOWSKI u. Mit-
arb., 1966a). Sie dürften jedoch hoch genug sein, um mittels
der Ureasewirksamkeit die Nutzung des Harnstoff-N für das Wachse-
tum des Versuchsorganismus zu erklären.

Die Tatsache, daß sich eine Urease nur auf Harnstoff, nicht
aber auf anorganischen N-Salzen als N-Quelle nachweisen läßt,
weist auf eine adaptive Ureasesynthese hin. Zum Nachweis, daß
es sich hierbei um eine adaptive Bildung und nicht um eine Se-
lektion ureasehaltiger M i c r o c o c c u s-Zellen auf dem
Harnstoffmedium handelt, wurde der Organismus a e r o b auf
Harnstoff als N-Quelle angezogen und dann ein Teil der Kultur
nach 24 beziehungsweise 48 Std. in eine neue Nährlösung mit
Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat als N-Quelle übergeimpft.

In Tab.6 sind die Ergebnisse der Aufwuchskulturen (Harnstoff
als N-Quelle) und der Umpflanzkulturen (Ammoniumchlorid + Ka-
liumnitrat als N-Quelle) wiedergegeben. Bereits 24 Std. nach

Tabelle 6: A e r o b e Kulturbedingungen: Spezifische Urease-
Aktivität in Acetonpulver-Extrakten (Tris-SO₄-Puffer-Extrakt)
von M i c r o c o c c u s d e n i t r i f i c a n s nach
Kultur auf Harnstoff und anschließender Umpflanzung auf Am-
moniumchlorid + Kaliumnitrat als N-Quelle

Versuchs- reihe Nr.	Wachstum auf N-Quelle	Spez. Aktivität in μmol Harn- stoff/mg Eiweiß/30 Min./37°C nach Std. Kulturdauer	
		24	48
1	Harnstoff	0,78	0,35
2	Harnstoff	0,50	0,27
	Umpflanzung auf		
3	Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat	0,0	0,0
4	Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat	0,0	0,0

Umpflanzung derjenigen Kulturen, die 24 Std. nach Aufzucht auf Harnstoff eine deutliche Ureasewirksamkeit zeigen, ist auf Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat als N-Quelle keine Urease mehr nachzuweisen. Gleiche Ergebnisse zeigen die nach 48 Std. umpflanzten Kulturen. - Das Einstellen der Ureasesynthese bei Angebot der anorganischen N-Salze spricht für eine adaptive Bildung der Urease, die durch den Harnstoff im Nährmedium induziert worden war.

3. Die spezifischen Aktivitäten der Urease in Abhängigkeit von der N-Quelle und Kulturdauer unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Im Zusammenhang mit den Bestimmungen der spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus in Abhängigkeit von der Kulturdauer interessierte, ob auch die bei diesen Versuchen geprüften N-Quellen eine Ureasesynthese induzieren.

a) Der Einfluß von Harnstoff und Glutamin auf die Ureasebildung unter aeroben Kulturbedingungen

Versuchsansatz: M. d e n i t r i f i c a n s wurde 24 Std. lang auf Schrägagar vorgezogen und dann auf die Nährlösungen mit den jeweils zu prüfenden Verbindungen als alleinige N-Quelle übertragen. Die Ernte und Analyse erfolgte nach 12, 24, 30 und 48 Std. Kulturdauer.

In Abb.38 sind die spezifischen Aktivitäten der Urease in Abhängigkeit von der Kulturdauer graphisch dargestellt worden (beachte den um eine Zehnerpotenz kleineren Maßstab gegenüber den folgenden Abbildungen). Daß keine Urease auf der N-Quelle Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat gebildet wird, war schon in Kapitel III, 1 (siehe S.85) besprochen worden. Auf Harnstoff als N-Quelle steigt die spezifische Aktivität der Urease bis zum Zeitpunkt 24 Std. kontinuierlich an. Obwohl das Wachstum (sic-

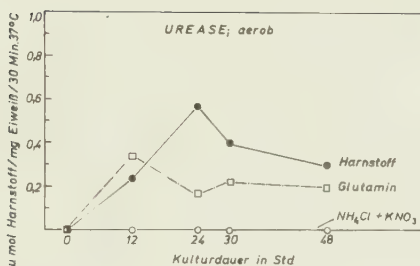


Abbildung 38: A e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff und Glutamin auf die Synthese der Urease von *Micrococcus denitrificans*

he Abb.4, S.21) noch bis 48 Std. anhält, ist ab 24 Std. Kulturdauer die Enzymsynthese geringer. Nach 48 Std. ist nur noch etwa 50% der zum Zeitpunkt 24 Std. gemessenen spezifischen Aktivität vorhanden. Bei Glutamin als N-Quelle wird ebenfalls Urease gebildet, jedoch liegen die spezifischen Aktivitäten im Verlaufe der Kultur niedriger als bei den Ansätzen mit Harnstoff.

Faßt man die Ergebnisse über die Ureasebildung von *M. denitrificans* unter aeroben Kulturbedingungen auf den N-Quellen Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff und Glutamin, also der Gruppe derjenigen N-Quellen, aus denen leicht Ammonium freigesetzt wird, zusammen, so ergibt sich, daß die Bildung dieses Enzyms nicht nur durch das Substrat Harnstoff, sondern auch durch Glutamin induziert wird. Die Enzymsynthese wird anscheinend durch unterschiedliche Mengen von Ammonium-Ionen repressiv reguliert (C. KÖNIG u. Mitarb., 1966; C.KÖNIG u. H.G. SCHLEGEL, 1967 und I. MAGANA-PLAZA u. J. RUIZ-HERRERA,

1967). Damit ist auch eine Erklärung für die relativ niedrigen spezifischen Aktivitäten auf den N-Quellen Harnstoff und Glutamin im Vergleich zu den Werten in den folgenden Versuchsreihen gegeben.

b) Der Einfluß von Glutaminsäure, Asparaginsäure und Alanin auf die Ureasebildung unter aeroben Kulturbedingungen

Werden diese Grundaminosäuren als alleinige N-Quelle geboten (Abb.39), so wird eine Ureasesynthese induziert, die wesentlich stärker ist als bei Harnstoff und Glutamin. Generell wurden im Verlaufe der Kultur Werte gemessen, die um etwa eine Zehnerpotenz und mehr über dem höchsten Meßwert in Abb.38 liegen. Allerdings sind die Einflüsse der einzelnen Aminosäuren unterschiedlich. Glutaminsäure und Asparaginsäure bewirken bis 12 Std. eine gleich starke Förderung (spez.Akt. 8,2). Im weiteren Verlaufe der Kultur sinkt die spezifische Aktivität. Setzt man den 12 Std.-Wert gleich 100%, so sind bei Glutamin-

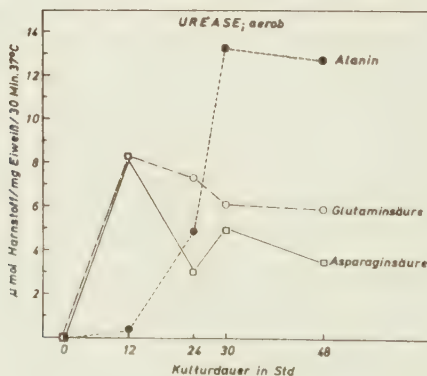


Abbildung 39: A e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Glutaminsäure, Asparaginsäure und Alanin auf die Synthese der Urease von *Micrococcus denitrificans*

säure nach 48 Std. noch 72% und bei Asparaginsäure nur 43% dieser Aktivität vorhanden. Vergleicht man die Wachstumskurven (siehe Abb.5, S.22) dieser beiden Aminosäuren mit der Enzymsynthese, so ist bemerkenswert, daß mit der starken Wachstumszunahme die Ureasebildung nicht im gleichen Maße ansteigt. Wird aber Alanin als alleinige N-Quelle geboten, so steigt parallel mit der Zellvermehrung (siehe Abb.5, S.22) die Enzymsynthese in den ersten 30 Std. der Kulturdauer an und bleibt bis 48 Std. auf der erreichten Höhe.

Es muß festgehalten werden, daß beim Wachstum auf diesen Grundaminosäuren eine kräftige Ureasebildung stattfindet. Die Einflüsse der einzelnen Aminosäuren sind jedoch unterschiedlich. Während bei Glutaminsäure und Asparaginsäure besonders in jungen Kulturen die Ureasebildung gefördert ist, bewirkt Alanin einen zunächst langsamen, dann aber starken Anstieg der Aktivitätskurve. Betrachtet man hierzu den Aktivitätsverlauf der Arginase auf den genannten N-Quellen (siehe Abb.26, S.61), so zeigt es sich, daß auch dieses Enzym bei Asparaginsäure und Glutaminsäure am Anfang der Kulturen die höchste Syntheserate aufweist und danach an Aktivität verliert. Ebenso ist bei der N-Quelle Alanin ein Zusammenhang zwischen der Urease- und Arginasebildung zu erkennen.

c) Der Einfluß von Ornithin, Citrullin und Arginin auf die Ureasebildung unter aeroben Kulturbedingungen

Nach den in Abb.40 graphisch dargestellten Analysen fördern alle Aminosäuren des Ornithin-Cyclus die Ureasesynthese in M. denitrificans stark. Setzt man z.B. die Durchschnittswerte der Meßpunkte für die spezifischen Aktivitäten

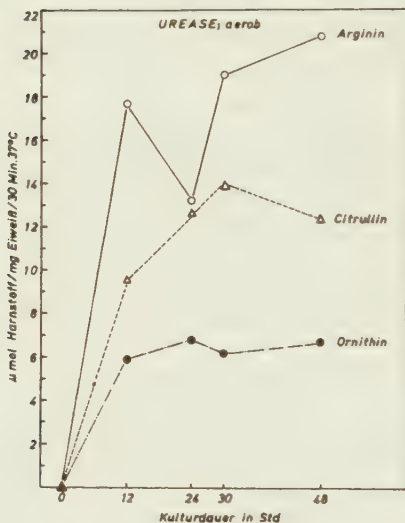


Abbildung 40: A e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Ornithin, Citrullin und Arginin auf die Synthese der Urease von *Micrococcus denitrificans*

nach Wachstum auf Ornithin, Citrullin und Arginin in Beziehung zueinander, so erhält man in der genannten Reihenfolge eine Förderung im Verhältnis von 6,4 : 12,0 : 17,7. Alle drei Aminosäuren fördern die Ureasesynthese innerhalb der ersten 12 Std. Kulturdauer am stärksten. Vergleicht man die Wachstumskurven (siehe Abb.6, S.23) mit den Enzymsynthesen so ergibt sich für Ornithin, daß, obwohl diese Aminosäure erst in der älteren Kultur (ab 30 Std.) eine deutliche Wachstumszunahme erzeugt, die Ureasebildung aber gerade in der jungen Kultur stark gefördert ist. Auch für die N-Quellen Citrullin und Arginin gilt diese Beziehung. Damit wird deutlich, daß die Ureasesynthese nicht durch die Wachstumszunahme, sondern durch die gebotenen

Substrate induziert wird.

Es ist nach diesen Untersuchungen die Urease in a e r o b gezogenen Kulturen von *M. d e n i t r i f i c a n s* als ein adaptiv ureolytisches Enzym zu betrachten, das durch verschiedene N-Quellen verschieden stark induziert wird.

d) Der Einfluß verschiedener N-Quellen auf die Ureasebildung unter anaeroben Kulturbedingungen

Versuchsansatz: Zur Kultur von *M. d e n i t r i f i c a n s* unter a n a e r o b e n Bedingungen mußte (mit Ausnahme der Kultur auf Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat) eine Vorkultur eingeschaltet werden (siehe Material und Methoden, S.10), ehe der Versuchsorganismus auf die neue Nährlösung mit N_2/CO_2 -Begasung umgepflanzt werden konnte. Die Ernte und Analyse erfolgte wiederum nach 12, 24, 30 und 48 Std. Kulturdauer.

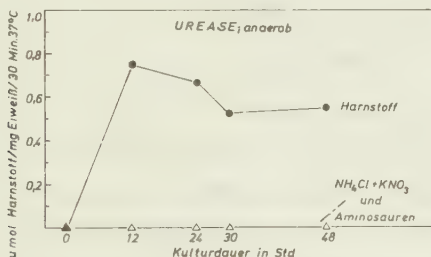


Abbildung 41: A n a e r o b e Kulturbedingungen: Einfluß von Harnstoff, Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Glutamin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin, Ornithin, Citrullin und Arginin auf die Synthese der Urease von *M i c r o c o c c u s d e n i t r i f i c a n s*

Die in Abb.41 zusammengefaßten Analysenergebnisse zeigen, daß unter a n a e r o b e n Kulturbedingungen, mit Ausnahme auf Harnstoff, zu keiner Erntezeit eine meßbare Urease-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Es erfolgt also lediglich eine Induktion durch das Substrat für das Enzym, wobei sogar im Durchschnitt etwa doppelt so hohe spezifische Aktivitäten wie bei

der a e r o b e n Parallelkultur (vgl. Abb.38) gemessen wurden.

4. Diskussion der Ergebnisse über die Ureasebildung von M i c r o c o c c u s d e n i t r i f i c a n s

Über Adaptationen von Zellen an das Substrat Harnstoff durch Ausbildung einer Urease wird von mehreren Autoren berichtet (siehe u.a. W.E. DETURK, 1955; W. KÄPPLER, 1963; F. LIEBEN u. K. SPRINGER, 1964; I. MAGANA-PLAZA u. J. RUIZ-HERRERA, 1967). Bei *P s e u d o m o n a s f l u o r e s c e n s* kommt allerdings D.J. STEWART (1965) zu einem gegenteiligen Ergebnis. Die Ureasebildung wird durch Harnstoff unterdrückt, während in einem harnstofffreien Medium Urease nachweisbar ist. Der Befund, daß es bei unseren Untersuchungen auf Harnstoff und Glutamin zu einer geringeren Ureasewirkung als bei den anderen geprüften Aminosäuren kommt, ist wahrscheinlich dadurch bedingt, daß sich vermehrt Ammoniak im Nährmedium ansammelt und repressiv die Enzyymbildung reguliert. Darauf weist auch der Befund hin, daß auf der anorganischen N-Quelle (Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat) keine Urease gefunden wurde. Hierzu sei auch auf die Untersuchungen von C. KÖNIG u. Mitarb. (1966), C. KÖNIG u. H.G. SCHLEGEL (1967) und I. MAGANA-PLAZA u. J. RUIZ-HERRERA (1967) verwiesen, die bei *H y d r o g e n o m o n a s* H16 und *P r o t e u s r e t t g e r i* repressive Einflüsse durch Ammonium-Ionen auf die Ureasebildung nachweisen konnten. - Hervorzuheben ist der stark fördernde Einfluß von Aminosäuren auf die Ureasesynthese unter a e r o b e n Bedingungen. Zu praktisch gleichen Ergebnissen, von einigen quantitativen Unterschieden abgesehen, gelangte auch L. ECKERT (1968) bei seinen

Untersuchungen an *Endomycopsis vernalis*. Allerdings hemmt hier im Gegensatz zu den Befunden bei *M. denitrificans* Asparaginsäure die Synthese der Urease, während Ornithin die Enzyymbildung nur schwach fördert. Mit Arginin und Citrullin konnten auch M. CASTANEDA u. Mitarb. (1967) bei *Neurospora crassa* eine Erhöhung der Ureasesynthese herbeiführen. In Verbindung mit der Förderung der Enzyme des Ornithin-Cyclus (siehe Abb.8 - 37) kann geschlossen werden, daß immer dann eine Ureasesynthese erfolgt, wenn Harnstoff als Substrat vorliegt, oder über den Ornithin-Cyclus gebildet wird (Ausnahme: Repression durch hohe Ammoniumkonzentrationen im Nährmedium).

Es erhebt sich nun die Frage, warum unter *anaeroben* Bedingungen bei den gleichen Aminosäuren die Enzyymbildung völlig eingestellt wird und nur Harnstoff eine Ureasesynthese induziert. Der letztere Fall schließt weitgehend aus, daß die Abwesenheit von Sauerstoff dafür verantwortlich zu machen ist, daß keine Enzymsynthese stattfindet. Eine mögliche Erklärung hierfür kann darin gesehen werden, daß unter *anaeroben* Bedingungen das Wachstum in fast allen Fällen (Ausnahme ist die anorganische N-Quelle) gehemmt ist, wozu weiterhin der Befund kommt, daß eine Reihe von Enzymen des Ornithin-Cyclus unter diesen Kulturbedingungen stark gehemmt werden (siehe Abb. 20, 21, 25, 27, 30, 31, 33, 35 und 37). Der Ablauf des Ornithin-Cyclus ist damit also gestört und die Harnstoffbildung ganz oder weitgehend unterdrückt. Die Tatsache, daß auf Harnstoffmedium auch unter *anaeroben* Bedingungen eine Ureasesynthese erfolgt, weist darauf hin, daß die gestörte Syn-

these des Harnstoffs (über den Ornithin-Cyclus) als Grund für die fehlende Ureasebildung angesehen werden kann. - Damit wird unterstrichen (vgl. H. KATING, 1962b), daß der Ornithin-Cyclus und der Harnstoff bei der Assimilation von Stickstoff bei Mikroorganismen eine wesentliche Rolle spielen.

D. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Bei *Micrococcus denitrificans* Beijerinck, einem fakultativen Anaerobier, wurden nach Anzucht auf verschiedenen N-Quellen sowohl unter *a e r o b e n* als auch *a n a e r o b e n* (N_2/CO_2 -Begasung) Kulturbedingungen in den Acetonpulver-Extrakten erstmals alle Enzyme des Ornithin-Cyclus nachgewiesen.
2. Vorversuche zu den Untersuchungen über die Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von verschiedenen N-Quellen und der Kulturdauer zeigten, daß der Versuchsorganismus unter *a e r o b e n* Bedingungen auf allen geprüften N-Quellen (Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat, Harnstoff, Glutamin, Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Ornithin, Citrullin, Arginin) wächst. Unter *a n a e r o b e n* Kulturbedingungen erfolgt eine Wachstumszunahme nur auf der anorganischen N-Quelle.
3. Carbamoylphosphat-synthetase: Sowohl Ammonium als auch Glutamin sind unter beiden Kulturbedingungen gute N-Donatoren für die Synthese von Carbamylphosphat (Ausnahme: Kultur auf Alanin und Harnstoff bewirkt nach 30 beziehungsweise 48 Std. eine Totalhemmung). Nach Kultur des Versuchsorganismus auf den verschiedenen N-Quellen ist zumeist die Bildung von Carbamylphosphat mit dem N-Donator Glutamin gesteigert; nach Wachstum auf Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat (aerob) ist jedoch die Synthese mit dem N-Donator Ammonium höher, während bei Harnstoff (anaerob) als N-Quelle die spezifische Aktivität des Enzyms bei beiden N-Donatoren gleich ist. Diese unterschiedliche Förderung der spezifischen Enzymaktivität nach Kultur auf den verschiedenen N-Quellen und beim Ein-

satz der beiden N-Donatoren machen es wahrscheinlich, daß zwei multiple Formen der Carbamoylphosphat-synthetase (=Isozyme) vorliegen.

4. Ornithincarbamoyl-transferase: Besonders Ornithin fördert unter *a e r o b e n* Bedingungen die Synthese des Enzyms, während Harnstoff, Asparaginsäure und Glutaminsäure stark hemmend wirken. Bei Wachstum auf Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat steigt in der jungen Kultur unter *a e r o b e n* Bedingungen die spezifische Aktivität des Enzyms stark an, während bei der N-Quelle Arginin eine deutliche Aktivitätszunahme nur in der älteren Kultur gefunden wird. Im Zusammenhang mit den Befunden von R.F. RAMALEY u. R.W. BERNLOHR (1965) und R.W. BERNLOHR (1966) bei *B a c i l l u s l i c h e n i f o r m i s*, wo eine durch Ammonium induzierte Synthese dieses Enzyms (durch Arginin reprimiert) und weiterhin eine durch Arginin geförderte Bildung eines zweiten Enzyms gefunden wurde, wird auf das Vorhandensein von zwei verschiedenen Ornithincarbamoyl-transferasen (Isozyme) bei *M. d e n i t r i f i c a n s* geschlossen.

5. "Argininsynthetisierende Enzyme": Ornithin und Arginin fördern unter beiden Kulturbedingungen - besonders in der älteren Kultur - die Synthese dieses Enzymsystems am stärksten. Citrullin hat keinen Einfluß (*aerob*) oder hemmt die Enzymbildung (*anaerob*).

6. Arginase: Nach Anzucht unter *a e r o b e n* Bedingungen wird auf der anorganischen N-Quelle, den Aminosäuren des Ornithin-Cyclus und besonders auf Alanin die Bildung des Enzyms stark gefördert. Bemerkenswert ist die hohe spezi-

fische Aktivität der Arginase bei Kultur auf der anorganischen N-Quelle unter a n a e r o b e n Bedingungen.

7. Die Ergebnisse werden diskutiert. Es fällt u.a. auf, daß Ornithin als N-Quelle - vornehmlich unter a e r o b e n Kulturbedingungen - im Gegensatz zu den Befunden bei einigen anderen Mikroorganismen die Synthese aller Enzyme des Kreisprozesses fördert.
8. In Kulturen, die auf Ammoniumchlorid + Kaliumnitrat unter a e r o b e n und a n a e r o b e n Bedingungen aufwachsen, konnte keine Urease nachgewiesen werden.
9. Auf allen anderen N-Quellen wird unter a e r o b e n Kulturbedingungen eine Urease synthetisiert. Die spezifische Aktivität nach Wachstum auf Harnstoff oder Glutamin ist (wahrscheinlich durch erhöhte Ammoniumfreisetzung, vgl. oben Punkt 8) stark vermindert.
10. Unter a n a e r o b e n Bedingungen wird nur auf dem Harnstoffmedium eine Ureasesynthese induziert.

E. A R B E I T S V O R S C H R I F T E N

1. Prüfung auf Sauerstoff in den anaerob aufwachsenden Kulturen

Die Prüfung auf Sauerstoff in dem Gasgemisch, mit dem die Kulturen beschickt wurden, erfolgte nach der von J.A. ULRICH u. M. LARSEN (1948) beschriebenen Methode. Dazu werden in 100 ml Wasser folgende Reagenzien gelöst:

4,0 g Glucose
2,0 g Dinatriumhydrogenarsenat $\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$
0,003 g Methylenblau (85%)

Von dieser Lösung wurden 3 - 4 ml in ein Reagenzglas gegeben und bis zur völligen Entfärbung erhitzt. Das Reagenzglas blieb hierbei mit einem Gummistopfen, der mit einer Gaseinlaßkanüle und einem Bunsenventil versehen war, verschlossen. Danach wurde die Reagenzlösung sofort mit dem zu prüfenden Gas beschickt. Bei Abwesenheit von Sauerstoff im Gasstrom bleibt die Methylenblau-Lösung farblos.

2. Eichkurve zur Eiweißbestimmung

Zur Aufstellung der Eichkurve für das lösliche Eiweiß aus den Acetonpulver-Extrakten wurde nach der Methode von O.H. LOWRY u. Mitarb. (1951) verfahren. Hierzu werden folgende Reagenzlösungen benötigt:

Lösung A: 2% Natriumcarbonat (MG 106, Fa.Merck) in 0,1 n NaOH;

Lösung B: 0,5% Kupfersulfat $\cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ (Fa.Merck) in Wasser;

Lösung C: 1% Kalium-Natriumtartrat (Fa.Merck) in Wasser.

Eiweißreagenzlösung: Mischung aus 50 ml Lösung A, 1 ml Lösung B und 1 ml C (die Eiweißreagenzlösung ist einen Tag haltbar).

Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (Fa.Merck).

Als Eichlösung wurden 10 mg Serumalbumin vom Rind (Fa.Behring-

werke) in Wasser gelöst und davon Verdünnungsreihen aufgestellt, die in 1 ml Lösung Eiweißkonzentrationen von 10 bis 80 γ enthielten. Zu jeder Eiweißprobe wurden 5 ml Eiweißreagenzlösung hinzugefügt, die Reaktionslösungen gut umgeschüttelt und 10 Min. lang stengelassen. Danach wurde jede Probe mit 0,5 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz versetzt, und nach frühestens 30 Min. die Intensität der eintretenden Blaufärbung als Transmission bei $\lambda_{\max}$ 750 nm im Spektralphotometer gegen den Reagenzienblindwert gemessen. Alle Messungen wurden als Parallelbestimmungen durchgeführt.

Nach der in Abb. 42 wiedergegebenen Eichkurve wurden die Eiweißwerte der Acetonpulver-Extrakte bestimmt.

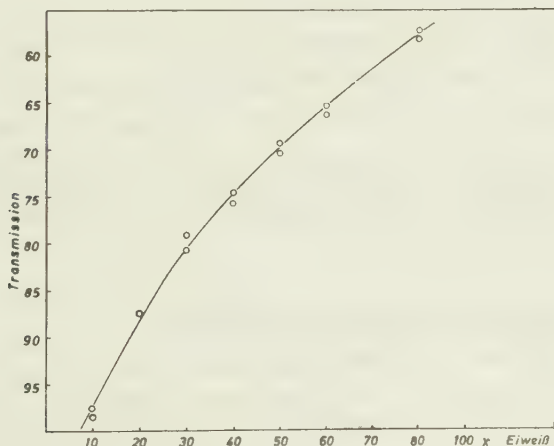


Abbildung 42: Eichkurve zur Eiweißbestimmung

3. Ammoniakbestimmung

Es wurde die von E.J. CONWAY beschriebene Methode benutzt (E.J. CONWAY, 1935; 1962 und E.J. CONWAY u. E. O'MALLEY, 1942). Zur

quantitativen Bestimmung des Ammoniaks wurde zuerst der äußere Rand der Conway-Schalen mit Exsikkatorfett leicht eingeschmiert und danach in die innere Kammer 1,0 ml Borsäure-Lösung gegeben⁵⁾. Die Reaktionslösungen wurden aus den Halbmikroreagenzgläsern in den äußeren Teil der Schalen überführt und die Reagenzgläser mit 0,5 ml deionisiertem Wasser nachgespült. Die Schalen wurden mit einem gefetteten Schliffdeckel so bedeckt, daß noch ein kleiner Spalt frei blieb. Durch diesen wurde 1,0 ml gesättigte Kaliumcarbonatlösung (110 g Kaliumcarbonat in 100 ml Wasser) hinzugefügt. Die Schalen wurden danach schnell verschlossen und die Lösungen durch kreisende Bewegungen gut gemischt. Die Schalen blieben danach mindestens 10 Std. bei Zimmertemperatur stehen. Während dieser Zeit wird das durch die Ureasewirkung freigesetzte und durch die Kaliumcarbonatlösung verdrängte Ammoniak von der Borsäure absorbiert. Mit n/100 HCl wurde die Borsäure (mit Indikator) auf den Ausgangsfarbtön (schwach rot) zurücktitriert. Hierfür wurde eine 0,2 ml Enzym-Test-Pipette mit 1/1000 ml Graduierung und einer Kolbenmikrometerschraube, die eine Ablesegenauigkeit von $\pm 1 \mu\text{l}$ hat, benutzt.

4. Berechnung einer spezifischen Enzymaktivität

Beispiel: Berechnung einer Urease-Aktivität

Verbrauch an n/100 HCl	= 0,993 ml (=Differenz zwischen Probe und Kontrolle)
1,0 ml n/100 HCl	= 0,3 mg (=300 μ) Harnstoff

5) Herstellung der Borsäure-Lösung: 5 g Borsäure werden in 200 ml Äthanol und 700 ml CO₂-freiem deionisiertem Wasser gelöst, mit 10 ml Mischindikator (0,033% Bromkresolgrün und 0,066% Methylrot in Äthanol) versetzt, mit CO₂-freiem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und mit einigen Tropfen 1 n NaOH auf einen schwach roten Farbtön eingestellt.

MG von Harnstoff = 60,0

Eiweißmenge in 0,5 ml Extrakt = 280 γ

1,000 ml n/100 HCl entsprechen also 300 γ Harnstoff

0,993 ml n/100 HCl entsprechen dann x γ Harnstoff

$$\frac{300 \gamma \text{ Harnstoff} \times 0,993 \text{ ml n/100 HCl}}{1,000 \text{ ml n/100 HCl}} = 298 \gamma \text{ Harnstoff}$$

wenn 280 γ Eiweiß - 298 γ Harnstoff entsprechen

so entsprechen 1000 γ Eiweiß - x γ Harnstoff

$$\frac{298 \gamma \text{ Harnstoff} \times 1000}{280 \gamma \text{ Eiweiß}} = 1060 \gamma \text{ Harnstoff/mg Eiweiß}$$

Die Umrechnung in μ mol Harnstoff ergibt sich folgendermaßen:

60 γ Harnstoff entsprechen 1 μ mol Harnstoff

1060 γ Harnstoff entsprechen x μ mol Harnstoff

$$\frac{1 \mu \text{mol Harnstoff} \times 1060 \gamma \text{ Harnstoff}}{60 \gamma \text{ Harnstoff}} = 17,7 \mu \text{mol Harnstoff}$$

Die spezifische Urease-Aktivität beträgt demnach 17,7 μ mol Harnstoff/mg Eiweiß.

In gleicher Weise wurden auch die spezifischen Aktivitäten der "argininsynthetisierenden Enzyme" und der Arginase errechnet.

5. Herstellung der Substratlösung zur Bestimmung der Aktivität der "argininsynthetisierenden Enzyme"

Nach der von S. RATNER (1955) beschriebenen Methode werden folgende Reagenzien benötigt:

600 mg Adenosin-5'-triphosphat-Na-Salz (ATP) (Fa.Boehringer)

350 mg L-Citrullin (Fa.Serva)

266,2 mg L-Asparaginsäure (Fa.Merck)

494 mg Magnesiumsulfat $\cdot$ 7 H₂O (Fa.Merck)

Die Substanzen wurden in 15 ml Wasser (0°C) gelöst, mit kalter 0,5 n Natronlauge auf den pH-Wert 7,4 eingestellt und mit kaltem Wasser auf 40 ml aufgefüllt. Jeder Analyse wurden 0,2 ml dieser Lösung zugesetzt. Die Lösung war bei Aufbewahrung im

Tiefkühlschrank bei -25°C einige Wochen lang haltbar.

6. Herstellung der Arginasepräparatlösung

5 mg Arginase (Fa. Sigma) und 112 mg Kobalt-(II)-Sulfat (Fa. Merck) wurden in 8 ml Eiswasser gelöst und in Vorratsproben zu je 2 ml bei -25°C eingefroren.

7. Herstellung der Ureasepräparatlösung

5 mg Urease "Merck" wurden in 1 ml eines 0,1 molaren Phosphat-Puffers mit dem pH-Wert 6,7 gelöst, im Kühlschrank aufbewahrt und zum Gebrauch davon 0,1 ml mit Wasser auf 1 ml verdünnt. 0,1 ml dieser Lösung enthält 50 μ g Urease.

8. Herstellung der Substratlösung für die Bestimmung der Carbamoylphosphat-synthetase-Aktivität

Hierfür wurden nach K. KLECZKOWSKI (1965) unter Eiskühlung in 15 ml deionisiertem Wasser gelöst:

600 mg Adenosin-5'-triphosphat-Na-Salz (ATP) (Fa. Boehringer)
206,1 mg Phosphoenol-pyruvat-K-Salz (Fa. Boehringer)
168,6 mg L-Ornithinmonochlorid (Fa. Merck)
740 mg Magnesiumsulfat $\cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Fa. Merck)

Nach Einstellung auf den pH-Wert 7,6 (mit kalter 0,5 n Natronlauge) wurde mit kaltem deionisiertem Wasser auf 40 ml ergänzt. In 0,2 ml dieser Lösung war die für jeden enzymatischen Versuchsansatz benötigte Substratmenge enthalten. Die Lösung war im Tiefkühlschrank bei -25°C einige Wochen lang haltbar.

9. Herstellung von Diammonium-carbamylphosphat

Nach der Vorschrift von R.L. METZENBERG u. Mitarb. (1960) zur Herstellung von Diammonium-carbamylphosphat werden folgende Chemikalien benötigt:

250,0 g Dowex 50 (NH_4^+ -Form, 200 Mesh)
32,4 g Kaliumcyanat
23,0 g Ammoniumdihydrogenphosphat
23 ml Eisessig
240 ml Ammoniak (2 mol)
2000 ml Äthanol (95%)

Das Dowex wurde etwa 12,5 cm hoch in einer Säule von 4 cm Durchmesser eingefüllt. Hierauf wurden 100 ml einer 4 molaren Kaliumcyanat-Lösung gegeben. Die ersten 40 ml Durchlauf wurden verworfen, die nächsten 60 ml aufgefangen. Die Säule wurde mit 140 ml deionisiertem Wasser gewaschen und das Eluat mit dem vorhergehenden vereinigt. Man erhielt so eine 2 molare Ammoniumcyanat-Lösung. Dieser Lösung wurde bei 37°C (Wasserbad) 23 g Ammoniumdihydrogenphosphat zugegeben. Nach 5 Min. Wartezeit wurden 23 ml Eisessig tropfenweise zugesetzt. Danach wurde die Lösung in 500 ml deionisiertes Wasser von 1°C gegossen, 240 ml eiskalte 2 molare Ammoniak-Lösung hinzugefügt, mit kaltem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und dann 1500 ml Äthanol (0°C) hinzugefügt. Es entstand eine milchige Trübung. Nach nochmaliger Zugabe von 500 ml Äthanol wurde die Lösung für 1 Std. in ein Eisbad gestellt und gelegentlich umgerührt. Das ausgefallene Ammoniumhydrogenphosphat wurde mit einer Glasfritte G 2 abgetrennt und verworfen. Die Lösung wurde für 48 Std. bei -25°C in einen Tiefkühlschrank gestellt. Die während dieser Zeit ausgefallenen Kristalle wurden auf einem Papierfilter gesammelt, mit Äthanol und Äther gewaschen, an der Luft getrocknet und danach in einer 4%igen wäßrigen Salzlösung, der die doppelte Menge Äthanol (95%ig von 0°C) hinzugefügt wurde, umkristallisiert. Nach 48 Std. (Aufstellung im Tiefkühlschrank) wurde abfiltriert und gewaschen. Das Diammonium-carbamylphosphat lag in großen,

glänzenden Flocken vor, die 24 Std. lang über Phosphorpentoxyd im Vakuumexsikkator bei Zimmertemperatur getrocknet wurden. Die Substanz war bei kühler Aufbewahrung über einem Trocknungsmittel etwa 2 Monate haltbar.

Die Reinheit des Präparates kann mittels der Ornithincarbamoyltransferase-Bestimmung unter Verwendung des Acetonpulver-Extraktes geprüft werden. Die Konzentrationen von L-Ornithin und des Diammonium-carbamylphosphats wurden hierzu auf $5\text{ }\mu\text{mol}$ reduziert. Enzymatische Tests ergaben, daß das Präparat einen Reinheitsgrad von nahezu 100% hatte.

10. Aufstellung der Eichkurve zur Citrullinbestimmung

Nach der von R.M. ARCHIBALD (1944) beschriebenen Methode werden folgende Reagenzien benötigt:

3%ige wäßrige Diacetylmonoximlösung (Fa.Schuchardt)

Citrullin-Reagenz-Lösung:

100 ml Schwefelsäure (95 - 97%, Fa.Merck)

300 ml o-Phosphorsäure (85%, Fa.Merck)

Eisen-(III)-Chlorid (Fa.Merck)

Zur Herstellung der Citrullin-Reagenz-Lösung wurden die beiden Säuren gemischt. Mit deionisiertem Wasser wurde auf 1000 ml aufgefüllt. Hierin wurden (nach Abkühlung) 5×10^{-5} Mol Eisen-(III)-Chlorid gelöst.

Für die Eichkurve wurde die Farbintensität bestimmter Citrullinkonzentrationen (L-Citrullin, Fa.Serva) bei 490 nm im Koordinatensystem eingetragen. Hierzu wurden zunächst 10 mg Citrullin in Wasser gelöst und Verdünnungsreihen aufgestellt, die pro 1 ml Lösung Citrullinkonzentrationen von 6 bis 80γ enthielten. Zu jeder Probe wurden 5 ml Citrullin-Reagenz-Lösung und 0,25 ml Diacetylmonoximlösung hinzugefügt, gut geschüttelt und die Ge-

fäße mit zum Druckausgleich durchbohrten Gummistopfen verschlossen; 15 Min. lang wurden die Proben in einem verschlossenen Gefäß im siedenden Wasser erhitzt und danach in Eiswasser abgekühlt. Die entstandene Farblösung wurde bei 490 nm im Spektralphotometer (PMQ II, Fa. Zeiss) gegen den Blindwert der Reagenzienlösung gemessen. - Da der gelbliche bis rötliche Farbkomplex lichtempfindlich ist und sich allmählich zersetzt, ist es zweckmäßig, abgedunkelt zu arbeiten und die Messung innerhalb von 20 Min. durchzuführen.

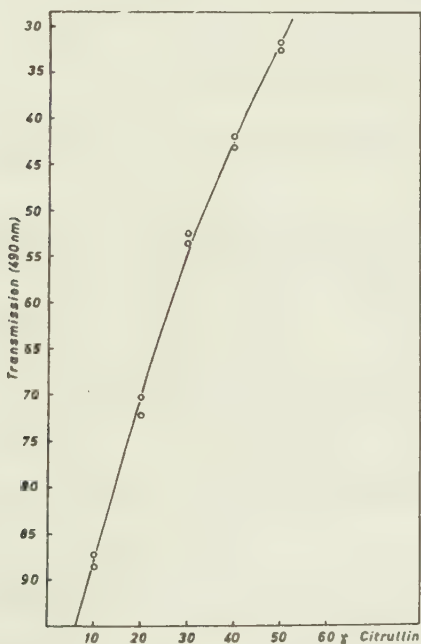


Abbildung 43: Eichkurve zur Citrullinbestimmung

Zum Aktivitätsnachweis der Carbamoylphosphat-synthetase und der Ornithincarbamoyl-transferase wurde folgendermaßen vorgegangen: Die Reaktionslösungen mit dem Acetonpulver-Extrakt (siehe Methode, S.14) wurden aus den Halbmikroreagenzgläsern in normale Reagenzgläser (1,5 x 16 cm) dekantiert und 5 ml Citrullin-Reagenz-Lösung sowie 0,25 ml Diacetylmonoximlösung zugegeben. Die weiteren Operationen waren die gleichen wie sie weiter oben bei der Aufstellung der Eichkurve beschrieben worden sind. Mit den Transmissionswerten kann die Citrullinmenge aus der Eichkurve in γ -Werten abgelesen werden.

Errechnung der spezifischen Aktivität der Ornithincarbamoyl-transferase:

Aus der Eichkurve entnommene
Menge gebildetes Citrullin = 11,0 γ (=Differenz zwischen Probe und Kontrolle)

Eiweißmenge in 0,2 ml Extrakt = 33,0 γ

MG von Citrullin = 175,0

33 γ Eiweiß	entsprechen also	11 γ Citrullin
1000 γ Eiweiß	entsprechen dann	x γ Citrullin

$\frac{11 \gamma \text{ Citrullin} \times 1000}{33 \gamma \text{ Eiweiß}} = 334 \gamma \text{ Citrullin/mg Eiweiß}$

Die Umrechnung in μ mol ergibt sich folgendermaßen:

175 γ Citrullin entsprechen 1 μ mol Citrullin

334 γ Citrullin entsprechen x μ mol Citrullin

$\frac{1 \mu\text{mol Citrullin} \times 334 \gamma \text{ Citrullin}}{175 \gamma \text{ Citrullin}} = 1,9 \mu\text{mol Citrullin/mg Eiweiß}$

Die spezifische Aktivität der Ornithincarbamoyl-transferase ist demnach 1,9 μ mol Citrullin/mg Eiweiß. In gleicher Weise wurde auch die spezifische Aktivität der Carbamoylphosphat-synthetase errechnet.

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- ARCHIBALD, R.M.: Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma. J. Biol. Chem. 156, 121-142 (1944).
- BACH, S.J. und J.D. KILIP: Purification and crystallisation of arginase. Biochim. Biophys. Acta 29, 273-280 (1958).
- BANERJEE, A.K.: Physiologische Untersuchungen an *Micrococcus denitrificans* Beijerinck und auxotrophen Mutanten. Isolierung auxotropher Mutanten und Spaltung des Cystathionins. Arch. Mikrobiol. 53, 107-131 (1966).
- BERNLOHR, R.W.: Ornithine transcarbamoylase enzymes: Occurrence in *Bacillus licheniformis*. Science 152, 87-88 (1966).
- BROWN, JR., G.M. und P.P. COHEN: Comparative biochemistry of urea synthesis. I. Methods for the quantitative assay of urea cycle enzymes in liver. J. Biol. Chem. 234, 1769-1774 (1959).
- BURACZEWSKI, S., K. KLECZKOWSKI und I. REIFER: Argininosuccinase in the green pea, regrass and wheat. Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol. 8, 93-95 (1960).
- CARAVACA, J. und S. GRISOLIA: Synthesis of citrulline with animal and bacterial enzymes. J. Biol. Chem. 235, 684-693 (1960).
- CASTANEDA, M., J. MARTUSCELLI und J. NORA: The catabolism of L-arginine by *Neurospora crassa*. Biochim. Biophys. Acta 141, 276-286 (1967).
- CHANG, J.P. und J.G. MORRIS: Studies on the utilization of nitrate by *Micrococcus denitrificans*. J. gen. Microbiol. 29, 301-310 (1962).
- CONWAY, E.J.: Apparatus for the micro determination of certain volatile substances. IV. The blood ammonia, with observations on normal human blood. Biochem. J. 29, 2755-2772 (1935).
- - Microdiffusion analysis and volumetric error. London 1962.
- CONWAY, E.J. und E. O'MALLEY: Microdiffusion Methods. Ammonia and urea using buffered absorbents (revised methods for ranges greater than 10 μ g N). Biochem. J. 36, 655-661 (1942).
- COOK, A.R. und D. BOULTER: Utilisation of urea by *Candida flaveri*. Phytochemistry 3, 313-319 (1964).

- DAVISON, D.C. und W.H. ELLIOTT: Enzymic reaction between arginine and fumarate in plant and animal tissues. *Nature* 169, 313-314 (1952).
- DETURK, W.E.: The adaptive formation of urease by washed suspensions of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bact.* 70, 187-191 (1955).
- DIXON, B. und A.H. ROSE: The synthesis of ornithine carbamoyl-transferase in biotin-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *J. gen. Microbiol.* 34, 229-240 (1964).
- ECKERT, L.: Der Einfluß verschiedener N-Quellen auf die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus bei *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis*. (Mit einem Beitrag über die Urease von *Endomycopsis vernalis*). Dissertation, Marburg (1968).
- ECKERT, L., K. KLECZKOWSKI und H. KATING: Untersuchungen zum Stoffwechsel des Harnstoffs in Mikroorganismen. V. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus bei *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis* in Abhängigkeit von der N-Quelle. *Arch. Mikrobiol.* 55, 54-65 (1966).
- FEWSON, C.A. und D.J.D. NICHOLAS: Respiratory enzymes in *Micrococcus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta* 48, 208-210 (1961).
- FINCHAM, J.R.S. und J.B. BOYLEN: A block in arginine synthesis in *Neurospora crassa* due to gene mutation. *Biochem. J.* 61, xxiii - xxiv (1955).
- GORINI, L.: Symposium on multiple forms of enzymes and control mechanism. III. Control by repression of the biochemical pathway. *Bact. Rev.* 27, 182-190 (1963).
- GORINI, L., M. GUNDERSEN und M. BURGER: Genetics of regulation of enzyme synthesis in the arginine biosynthetic pathway of *Escherichia coli*. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 26, 173-182 (1961).
- GREENBERG, D.M.: Arginase. In: S.P. COLOWICK und N.O. KAPLAN: *Methods in Enzymology* 2, 368-371. New York-London 1955.
- HALL, L.M., R.L. NETZENBERG und P.P. COHEN: Isolation and characterization of a naturally occurring cofactor of carbamyl phosphate biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 230, 1013-1021 (1958).
- ELLIOTT, U., K. KLECZKOWSKI und H. KATING: Untersuchungen zum Stoffwechsel des Harnstoffs in Mikroorganismen. VI. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des Ornithin-Cyclus in *Micrococcus denitrificans* Beij. *Arch. Mikrobiol.* 55, 311-319 (1967).

- JONES, M.E.: Carbamyl phosphate. *Science* 140, 1373-1379 (1963).
- JONES, M.E., L. SPECTOR und F. LIPMAN: Carbamyl phosphate, the carbamyl donor in enzymatic citrulline synthesis. *J. Amer. Chem. Soc.* 77, 819-820 (1955).
- KÄPPLER, W.: Der Einfluß verschiedener Nährmedien auf die Urease-Aktivität von saprophytären Mycobakterien. *Naturwissenschaften* 50, 722 (1963).
- KALMAN, S.M., P.H. DUFFIELD und T. BROZOZOWSKI: Identity in *Escherichia coli* of carbamyl phosphokinase and an activity which catalyzes amino group transfer from glutamine to ornithine in citrulline synthesis. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 18, 530-537 (1965).
- KALTWASSER, H.: Induktive Bildung partikelgebundener Uricase bei *Hydrogenomonas H₁₆* und anderen aeroben Bakterien. *Arch. Mikrobiol.* 60, 160-171 (1968).
- KALTWASSER, H., G. VOGT und H.G. SCHLEGEL: Polyphosphatsynthese während der Nitrat-Atmung von *Micrococcus denitrificans* Stamm 11. *Arch. Mikrobiol.* 44, 259-265 (1962).
- CASTING, R. und C.C. DELWICHE: Ornithine, citrulline and arginine metabolism in watermelon seedlings. *Plant Physiol.* 22, 350-354 (1958).
- KATING, H. Untersuchungen über den Stoffwechsel des Harnstoffs bei Mikroorganismen. I. Zur Harnstoffsynthese bei *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis*. *Biochem. Z.* 335, 351-365 (1962a).
- - Untersuchungen über den Stoffwechsel des Harnstoffs bei Mikroorganismen. II. Die Verarbeitung des Harnstoffs bei *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis*. *Biochem. Z.* 335, 366-381 (1962b).
- - Harnstoff-Synthese über den Ornithin-Cyclus in jungen Gerstenwurzeln. *Biochem. Z.* 336, 489-494 (1963).
- KLECZKOWSKI, K.: Biosynthesis of citrulline in bean seedlings. *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. Biol.* 5, 83-87 (1957).
- - L-Glutamine as donor of carbamoyl group nitrogen for the enzymic synthesis of citrulline in green pea seedlings. *Acta Biochim. Pol.* 12, 243-249 (1965).
- KLECZKOWSKI, K. und P.P. COHEN: Purification of ornithine trans-carbamylase from pea seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* 107, 271-278 (1964).
- KLECZKOWSKI, K., L. ECKERT und H. KATING: Untersuchungen zum Stoffwechsel des Harnstoffs bei Mikroorganismen. III. Zur Wirkung der Urease von *Endomycopsis vernalis* und Nachweis der Ureasefreiheit von *Torulopsis utilis*. *Arch. Mikrobiol.* 54, 106-114 (1966a).

- KLECZKOWSKI, K., U. HIORT und H. KATING: Untersuchungen zum Stoffwechsel des Harnstoffs bei Mikroorganismen. IV. Adaptive Ureasebildung bei *Micrococcus denitrificans* Beij. Arch. Mikrobiol. 54, 177-183 (1966).
- KLUYVER, A.J. und W. VERHOEVEN: Studies on true dissimilatory nitrate reduction. II. The mechanism of denitrification. *Antonie v. Leeuwenhoek J. Serol. Microbiol.* 20, 241-262 (1954a).
- - Studies on true dissimilatory nitrate reduction. IV. On adaptation in *Micrococcus denitrificans*. *Antonie v. Leeuwenhoek J. Serol. Microbiol.* 20, 337-358 (1954b).
- KÖNIG, C., H. KALTWASSER und H.G. SCHLEGEL: Die Bildung von Urease nach Verbrauch der äußeren N-Quelle bei *Hydrogenomonas H16*. Arch. Mikrobiol. 53, 231-241 (1966).
- KÖNIG, C. und H.G. SCHLEGEL: Oscillationen der Ureaseaktivität von *Hydrogenomonas H16* in statischer Kultur. *Biochim. Biophys. Acta* 139, 182-185 (1967).
- KOSSMANN, K.T., K. LANGE und F. MENNE: Anreicherung von Arginase aus Schweinelungen. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 335, 250-254 (1964).
- KREBS, H.A. und K. HENSELEIT: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 210, 33-66 (1932).
- LACROUTE, F., A. PIERARD, M. GRENSON und J.M. WIAME: The biosynthesis of carbamoyl phosphate in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. gen. Microbiol.* 40, 127-142 (1965).
- LEVENBERG, B.: Role of L-glutamine as donor of carbamyl nitrogen for the enzymatic synthesis of citrulline in *Agaricus bisporus*. *J. Biol. Chem.* 237, 2590-2598 (1962).
- LIEBEN, F. und K. SPRINGER: Über induzierte Bildung von Urease. *Enzymologia* 27, 47-53 (1964).
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR und R.J. RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951).
- MAGANA-PLAZA, I. und J. RUIZ-HERRERA: Mechanisms of regulation of urease Biosynthesis in *Proteus rettgeri*. *J. Bacteriol.* 92, 1294-1301 (1967).
- METZENBERG, R.L., M. MARSHALL und P.P. COHEN: Carbamoyl phosphate synthetase: Studies on the mechanism of action. *J. Biol. Chem.* 233, 1560-1564 (1958).
- - Carbamyl phosphate. *Biochemical preparations* 7, 23-26. New York 1960.

- MOKRASCH, L.C., J. CARAVACA und S. GRISOLIA: A highly active carbamate kinase and its application to the regeneration and preparation of [³²P] adenine nucleotides. *Biochim. Biophys. Acta* 27, 442-447 (1960).
- MÜTZE, B.: Der Einfluß des Lichtes auf *Micrococcus denitrificans* Beijerinck. *Arch. Mikrobiol.* 46, 402-408 (1963).
- PAUL, J., P.F. FOTTELL, I. FRESHNEY, W.R. JONDORF und M.G. STRUTHERS: Regulation of enzyme synthesis in cultured cells. *Natl. Cancer Inst. Monograph* 12, 219-228 (1964).
- PICHINOTY, F.: A propos des nitrate-réductases d'une bactérie dénitrifiante. *Biochim. Biophys. Acta* 89, 378-381 (1964).
- PICHINOTY, F. und L. D'ORNANO: Sur le mécanisme de l'inhibition par l'oxygène de la dénitrification bactérienne. *Biochim. Biophys. Acta* 52, 386-389 (1961).
- PIERARD, A., M. GLANSDORFF, M. MERGEAY und J.W. WIAME: Control of the biosynthesis of carbamoyl phosphate in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 14, 23-36 (1965).
- RAMALEY, R.F. und R.W. BERNLOHR: Apparent induction of ornithine transcarbamylase and arginase by arginine in *Bacillus licheniformis*. *J. Mol. Biol.* 11, 842-844 (1965).
- RATNER, S.: Enzymatic synthesis of arginine (condensing and splitting enzymes). In: S.P. COLOWICK und N.O. KAPLAN: *Methods in Enzymology* 2, 356-367. New York-London 1955.
- RATNER, S. und B. PETRACK: Biosynthesis of urea. III. Further studies on the arginine synthesis from citrulline. *J. Biol. Chem.* 191, 693-705 (1951).
- RAVEL, J.M., J.S. HUMPHREYS und W. SHIVE: A study of carbamyl-phosphate synthesis in *Streptococcus lactis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 92, 525-531 (1961).
- REIFER, I. und L. BURACZEWSKA: The ornithine cycle in pea seedlings. *Acta Biochim. Pol.* 5, 361-371 (1958).
- REIFER, I. und K. KLECZKOWSKI: Enzymatische und nichtenzymatische Citrullinsynthese. *Ztschr. f. Naturforsch.* 15b, 431-434 (1960).
- REUTER, G.: Reaktionen mit Carbamylphosphat unter zellmöglichen Bedingungen. *Ztschr. f. Naturforsch.* 14b, 475-476 (1959).
- SCHIMKE, R.T.: Repression of enzymes of arginine biosynthesis in mammalian tissue culture. *Biochim. Biophys. Acta* 62, 599-601 (1962).

- SCHIMKE, R.T.: Enzymes of arginine metabolism in mammalian cell culture. I. Repression of argininosuccinic synthetase and argininosuccinase. *J. Biol. Chem.* 239, 136-145 (1964).
- SRB, A.M. und N.N. HOROWITZ: The ornithine cycle in *Neurospora crassa* and its genetic control. *J. Biol. Chem.* 154, 129-139 (1944).
- STAUFF, J. und R. JAENICKE: Physikalische Chemie der Lösungen. In: H.M. RAUEN: Biochem. Taschenbuch, S. 97. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964.
- STEINER, M. und H. KATING: Harnstoffassimilation mit und ohne Ureasewirkung bei Mikroorganismen (*Endomycopsis vernalis*, *Torulopsis utilis*, *Willia anomala*). *Arch. Mikrobiol.* 28, 173-190 (1957).
- - Weitere Untersuchungen zur Kenntnis der Harnstoffassimilation bei *Torulopsis utilis* und *Endomycopsis vernalis*. *Flora* 150, 294-305 (1961).
- STEWART, D.J.: The urease activity of fluorescent pseudomonads. *J. gen. Microbiol.* 41, 169-174 (1965).
- SUMNER, J.B.: Urease. In: S.P. COLOWICK und N.O. KAPLAN: Methods in Enzymology 2, 178-379. New York 1955.
- UDAKA, S.: Pathway-spezifische pattern of control of arginine biosynthesis in bacteria. *J. Bact.* 91, 617-621 (1966).
- ULRICH, J.A. und M. LARSEN: A single solution indicator for anaerobiosis. *J. Bact.* 56, 373-374 (1948).
- VERHOEVEN, W.: Studies on true dissimilatory nitrate reduction. V. Nitric oxide production and consumption by microorganisms. *Antonie v. Leeuwenhoek J. Serol. Microbiol.* 22, 385-406 (1956).
- VERHOEVEN, W., A.L. KOSTER und M.C.A. VAN NIEVELT: Studies on true dissimilatory nitrate reduction. III. *Micrococcus denitrificans* Beijerinck, a bacterium capable of using molecular hydrogen in denitrification. *Antonie v. Leeuwenhoek J. Serol. Microbiol.* 20, 273-284 (1954).
- VERNON, L.P.: Electron transport systems of *Micrococcus denitrificans* and *Rhodospirillum rubrum*. *Proc. Intern. Symposium Enzyme Chem.*, Tokyo and Kyoto 2, 234-238 (1957).
- VERNON, L.P. und F.G. WHITE: Terminal oxidases of *Micrococcus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta* 25, 321-328 (1957).
- VOGEL, H.J. und D.M. BONNER: The use of mutants in the study of metabolism. In: W. RUHLAND: Handbuch der Pflanzenphysiologie 11, 1-32. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959.

- VOGT, M.: Wachstumsphysiologische Untersuchungen an *Micrococcus denitrificans* Beij. Arch. Mikrobiol. 50, 256-281 (1965).
- WALKER, J.B.: Argininosuccinic acid from *Chlorella*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 38, 561-569 (1952).
- WIELAND, T. und G. PFLEIDERER: Differenten und multiple Formen von Enzymen. Angew. Chem. 74, 261-270 (1962).
- WITT, I. und H. HOLZER: Hauptweg des NH_4^+ -Einbaues in Glucose-oxydierender Bäckerhefe. Biochem. Z. 339, 255-265 (1964).

Herrn Professor Dr. H. Kating danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für seine stete Hilfsbereitschaft und Förderung, die er mir hat zuteil werden lassen. - Ferner möchte ich Herrn Dozent Dr. K. Kleczkowski (Institut für Biochemie und Biophysik der Polnischen Akademie der Wissenschaften Warschau, Polen) für wertvolle Ratschläge zur Methode und anregende Diskussionen an dieser Stelle danken.

Lebenslauf

Am 25. Januar 1939 wurde ich als Sohn des Baurats Dr. Richard Hiort und seiner Ehefrau Anna, geb. Müller, in Glogau (Schlesien) geboren.

Durch die Räumung der Ostgebiete kam ich 1945 nach Wiesbaden. Von Ostern 1946 bis 1949 besuchte ich dort die Volksschule an der Lahnstraße und anschließend das Gymnasium Leibnizschule, an dem ich am 23. Juni 1958 die Reifeprüfung ablegte.

Nach längerer Krankheit trat ich am 1. April 1959 als Praktikant in die Drei Lilien-Apotheke in Wiesbaden ein und bestand am 2. März 1961 die Pharmazeutische Vorprüfung. Seit Juli 1960 bin ich verheiratet.

Ab SS 1961 studierte ich Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg/Lahn. Hier legte ich am 9. Oktober 1964 die Pharmazeutische Prüfung ab.

Im November 1964 begann ich am Institut für Pharmakognosie unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Kating die vorliegende Arbeit, die ich im Mai 1968 zum Abschluß brachte.

